



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2012

35531 Andreia Marques Gomes

Efeito do 3-bromopiruvato na pluripotência de mESCs



35531 Andreia Marques Gomes

Efeito do 3-bromopiruvato na pluripotência de mESC

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para obtenção do grau de Mestre (Mestrado em Biologia Aplicada, ramo Biologia Molecular e Celular), realizada sob a orientação científica do Professor Doutor João Ramalho-Santos e da Professora Doutora Anabela Rolo.

O júri

Presidente

Prof. João António de Almeida Serôdio

Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Arguente Principal

Prof. Valdemar Jesus Conde Máximo

Professor Associado Convidado, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e IPATIMUP - Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto

Vogal

Prof. Maria Da Conceição Lopes Vieira dos Santos

Professor Associado com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Orientador

Prof. João Ramalho de Sousa Santos

Professor Associado do Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra

Co - Orientador

Prof. Anabela Pinto Rolo

Professor Auxiliar Convidado do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Ao Professor Doutor João Ramalho-Santos, um muito obrigada pelos conhecimentos que me transmitiu, pela disponibilidade sempre demonstrada, pelo apoio e compreensão, pela amizade e pela oportunidade que me conferiu.

À Ana Sofia Rodrigues pela dedicação e paciência, pela disponibilidade e pelos conhecimentos que me transmitiu. O meu especial agradecimento.

À Professora Anabela Rolo pela amizade, carinho e conhecimentos que me transmitiu, pela disponibilidade para ajudar.

À Renata Tavares pelo apoio e atenção, pela disponibilidade para ajudar e pelos conhecimentos e companheirismo.

À Paula Mota, à Marta Baptista, à Carla Paiva, à Sandra Amaral pela amizade, pelo companheirismo e pela disponibilidade para ajudar. Obrigada pelos momentos de boa disposição.

À Inês pelos momentos divertidos, pelo companheirismo, pelo trabalho em equipa e pela amizade demonstrada.

Um agradecimento a todas as pessoas que fazem parte do grupo, Ana Paula, Bárbara, Patrícia, Andreia, Sónia, Solange, Alexandra, Sandro, Mónica, Marcelo, Tânia, e sem as quais seria impossível realizar esta etapa. Um muito obrigada pela recepção, pelo ambiente extraordinário e pelo apoio dado.

Um agradecimento especial à D.Gina, à Vera, à D.Fernanda pelos bons momentos de boa disposição, pela ajuda e disponibilidade sempre demonstrada e à Isabel Nunes pela preciosa ajuda.

Aos meus colegas de mestrado, em especial à Diana, à Susana, à Fernanda e à Carina, obrigada pelos bons momentos e pelo companheirismo.

Aos meus amigos em especial à Susana Rito, à Nasci, à Dora, à Maria João, à Rita, à Andreia, à Sónia, à Lia, à Ana, à Vânia, ao

Jão, ao Pedro, ao Filipe, ao Rui, ao Miguel e a todos os outros que não enumerei o meu agradecimento muito grande pelo apoio. Ainda um obrigada especial às companheiras de casa Cláudia e Sara.

Não poderia deixar de agradecer a quem me apoiou desde o início, obrigada pais, pela confiança e força que me transmitem para continuar mesmo nos momentos mais difíceis. Aos meus irmãos, Gonçalo e Catarina, pelos momentos vividos, pelos ensinamentos que me dão e pelo apoio.

Palavras-chave

3-bromopiruvato, células estaminais embrionárias de murganho (mESCs), pluripotência, metabolismo.

Resumo

As células estaminais embrionárias são caracterizadas pela sua capacidade de auto-renovação bem como pelo seu potencial de diferenciação em pluripotência. Estudos recentes demonstraram que as células estaminais pluripotentes possuem um baixo número de mitocôndrias e baixos níveis fosforilação oxidativa, utilizando preferencialmente a glicólise como fonte principal de ATP. Esta característica é partilhada com algumas células cancerígenas. O 3-bromopiruvato é um agente alquilante com efeitos antitumorais em vários modelos de tumores. Assim, o objectivo deste trabalho foi estudar o efeito do 3-bromopiruvato em células estaminais embrionárias de murganho. Para isso, foram usados estudos *in vitro* em células estaminais embrionárias de murganho (mESCs) para avaliar o efeito deste composto na pluripotência (através de marcadores como o Nanog e o Oct-4 e a fosfatase alcalina), na viabilidade e na actividade metabólica celular. Foi estudada a expressão das enzimas glicolíticas e a detecção do lactato extracelular bem como a actividade mitocondrial através da determinação do potencial membranar mitocondrial. Foram ainda quantificados os conteúdos em nucleótidos de adenosinas.

Neste estudo, mostrou-se que o estado indiferenciado das células estaminais foi afectado sem no entanto perderem a viabilidade. Além disso, a glicólise e a mitocôndria pareceram também não ser afectadas com o tratamento de 3-bromopiruvato. Assim, apesar de afectar a pluripotência, o 3-bromopiruvato não afectou o metabolismo destas células pelo menos nos parâmetros analisados.

Serão necessárias mais experiências para complementar este estudo de modo a perceber o efeito global do 3-bromopiruvato no metabolismo e pluripotência das células estaminais embrionárias de murganho.

Keywords

3-bromopyruvate, *mouse Embryonic Stem Cells* (mESCs), pluripotency, metabolism.

Abstract

Embryonic stem cells are characterized by their ability for self-renewal and their differentiation potential in pluripotency. Recent studies demonstrated that undifferentiated pluripotent stem cells display a low number of mitochondria and lower levels of oxidative phosphorylation, and instead preferentially use glycolysis as a major source of ATP. This feature is shared with some cancer cells. 3-bromopyruvate is an alkylating agent with antitumor effects in several models of animal tumors. Thus, the aim of this work was to study the effect of 3-bromopyruvate in mouse embryonic stem cells. Therefore, *in vitro* studies using mouse embryonic stem cells (mESCs) were performed to assess the effect of this compound in pluripotency (by markers such as Nanog and Oct-4 and alkaline phosphatase), viability and metabolic activity of the cells. In metabolism it was studied the expression of glycolytic enzymes and the detection of extracellular lactate as well the mitochondrial activity by the detection of mitochondrial membrane potential. It was also studied and quantified the contents of adenosines nucleotides.

In this study, it was shown that the undifferentiated state of stem cells decreased without losing viability of the cells. Also, glycolysis and mitochondria were not affected by the treatment. Thus, although it affected pluripotency, 3-bromopyruvate did not affect the metabolism of these cells at least in the parameters analysed. Importantly, many questions remain to be answered, so, additional experiments will be necessary to complement this work to better understand the global effect of 3-bromopyruvate in the metabolism and pluripotency of mouse embryonic stem cells.

Índice

Agradecimentos.....	IV
Resumo	VI
Abstract.....	VII
Índice	VIII
Lista de figuras.....	X
Lista de tabelas	XI
Lista de abreviaturas.....	XII
Introdução	1
1.1. Células estaminais	2
1.1.1. Células estaminais embrionárias Vs Células estaminais adultas	3
1.1.2. Células estaminais embrionárias de murganho ou mESCs	3
1.1.3. Reguladores intrínsecos da pluripotência	5
1.1.4. Reguladores extrínsecos da pluripotência.....	7
1.2. Mitocôndria e Metabolismo	9
1.2.1. Produção de energia: Fosforilação oxidativa vs glicólise.....	9
1.2.2. O papel da mitocôndria em células estaminais embrionárias.....	12
1.2.3. Espelho do metabolismo celular	13
1.3. 3-Bromopiruvato	15
1.3.1. Efeitos do bromopiruvato em células cancerígenas e noutros tipos celulares	16
1.4. Objectivos.....	18
Material e Métodos	19
2.1. Material.....	20
2.2. Cultura de células.....	20
2.3. Ensaio de viabilidade das mESCs.....	21
2.4. Ensaio da actividade metabólica das mESCs.....	22
2.5. Detecção do potencial membranar mitocondrial ($\Delta\psi_m$) por citometria de fluxo	22

2.6. Análise do conteúdo de nucleótidos de adenosina em mESCs por <i>High-performance liquid chromatography</i> (HPLC)	23
Soluções	23
○ Solução de extracção	23
○ Solução de neutralização	23
2.7. Detecção dos níveis de lactato no meio extracelular	24
2.8. Western blot	24
○ Tris buffer saline (TBS).....	24
○ Laemmli sample buffer (Bio-Rad).....	25
○ Tampão de corrida	25
○ Tampão de transferência	25
○ Solução de lavagem (TBST)	25
○ Solução de bloqueio	25
○ Solução para o anticorpo primário e secundário	26
2.9. Imunoperoxidase	28
2.10. Detecção da actividade da fosfatase alcalina (FA)	29
2.11. Análise estatística	30
Resultados	31
3.1. Efeito do 3-Bromopiruvato na actividade metabólica e na viabilidade celular	32
3.2. Efeito do 3-Bromopiruvato na pluripotência	33
3.3. Efeitos do 3-bromopiruvato no metabolismo celular	36
Discussão	41
4.1. O 3-bromopiruvato afecta a pluripotência	42
4.2. O 3-bromopiruvato não afecta a viabilidade celular	43
4.3. O 3-bromopiruvato não afecta o metabolismo celular nos parâmetros estudados ...	44
Conclusões e perspectivas futuras	47
Referências bibliográficas	49

Lista de figuras

Figura 1 – Origem e classificação das células estaminais embrionárias ao longo do desenvolvimento embrionário	2
Figura 2– A expressão relativa do nível de Oct-4 determina o destino das células estaminais.....	6
Figura 3 – Vias de sinalização que regulam a pluripotência de células estaminais embrionárias de murganho (mESCs).....	8
Figura 4 – Imagem representativa da cadeia transportadora de electrões mitocondrial que é composta por cinco complexos e dois transportadores de electrões que estão na membrana interna mitocondrial	10
Figura 5 – Via glicolítica	11
Figura 6 – Entrega de glucose e ATP à hexoquinase II em células cancerígenas e os destinos metabólicos da glucose-6-fosfato.....	14
Figura 7 – 3-bromopiruvato	15
Figura 8 – Efeito do 3-bromopiruvato na actividade metabólica determinado por MTT em 24, 48 e 62 horas de incubação.	32
Figura 9 – Efeito do 3-bromopiruvato na viabilidade celular determinado por SYBR® 14 e IP em 24, 48 e 62 horas de incubação.....	33
Figura 10 – Efeito do 3-bromopiruvato na pluripotência de mESCs – Nanog	34
Figura 11 – Efeito do 3-bromopiruvato na pluripotência de mESCs – Oct-4.	34
Figura 12 – Efeito do 3-bromopiruvato na pluripotência de mESCs – Actividade da fosfatase alcalina	35
Figura 13 – Efeito do 3-bromopiruvato no metabolismo de mESCs – Hexoquinase II	36
Figura 14 – Efeito do 3-bromopiruvato no metabolismo de mESCs – Níveis de expressão de GAPDH	37
Figura 15 – Efeito do 3-bromopiruvato no metabolismo de mESCs – Níveis de expressão de PKM1-2 e PDH.....	37
Figura 16 – Efeito do 3-bromopiruvato na produção de lactato	38
Figura 17 – Efeito do 3-bromopiruvato na produção de ATP e carga energética	39
Figura 18 – Efeito do 3-bromopiruvato no potencial membranar mitocondrial ($\Delta\psi_m$)	40

Lista de tabelas

Tabela 1 – Diferenças e semelhanças entre células estaminais embrionárias de murganho (mESC) e humanas (hESC).....	5
Tabela 2– Anticorpos primários utilizados na análise de <i>western blott</i> (WB) e Imunoperoxidase (IP).	28
Tabela 3 – Anticorpos secundários utilizados na análise de <i>western blott</i> (WB) e Imunoperoxidase (IP).	28

Lista de abreviaturas

μl - microlitro

μM - micromolar

3-BrPA – 3- ácido bromopirúvico ou 3-bromopiruvato

ADP – Adenosina difosfato

AIF – *apoptosis-inducing factor*

AMP – Adenosina monofosfato

ATP –Adenosina trifosfato

BAD –Promotor de morte associado a Bcl-2 (do inglês *Bcl-2-associated death promoter homolog*)

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic acid*)

ESCs – Células estaminais embrionárias (do inglês *embryonic stem cells*)

FA – Fosfatase alcalina

GADPH –Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (do inglês *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)

hESC – Células estaminais embrionárias humanas (do inglês *human Embryonic Stem Cells*)

HIF- factor indutor de hipóxia (do inglês *hypoxia inducible factor*)

HK –Hexoquinase (do inglês *Hexokinase*)

LIF – Factor inibidor da leukemia (do inglês *Leukemia inhibitor factor*)

mA – mili Ampere

mESCs – Células estaminais embrionárias de murganho (do inglês *mouse Embryonic Stem Cells*)

mg - miligrama

ml - mililitro

mRNA –Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês *messenger Ribonucleic acid*)

MTT – brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

PDC – Complexo da piruvato desidrogenase (do inglês *Pyruvate dehydrogenase complex*)

PDH –Piruvato desidrogenase (do inglês *Pyruvate dehydrogenase*)

PKM 1-2 –Piruvato quinase isozima muscular (do inglês *Pyruvate kinase muscle isozyme*)

ROS –Espécies reativas de oxigénio (do inglês *Reactive oxygen species*)

Rpm – rotações por minuto

V - volt

VDAC –Canal de aniões dependente de voltagem (do inglês *Voltage-dependent anion channel*)

Introdução

Capítulo 1

1.1. Células estaminais

Actualmente, as células estaminais representam uma fonte promissora importante na medicina regenerativa e na investigação biomédica.

As células estaminais são definidas principalmente com base em dois critérios: na capacidade de auto-renovação, na qual as células sofrem divisões celulares e pelo menos uma das células-filha é também estaminal, e no seu potencial de diferenciação para gerar diferentes tipos celulares que constituem o organismo (National Institutes of Health, 2004).

Durante o desenvolvimento de um organismo, as células que constituem o embrião perdem gradualmente o seu potencial de desenvolvimento e ganham funções mais especializadas. A classificação das células é baseada na organização hierárquica de diferenciação celular, assim de acordo com o potencial de diferenciação, as células estaminais podem ser divididas em quatro categorias, totipotência, pluripotência, multipotência, e unipotência (Figura 1) (Gilbert, 2010).

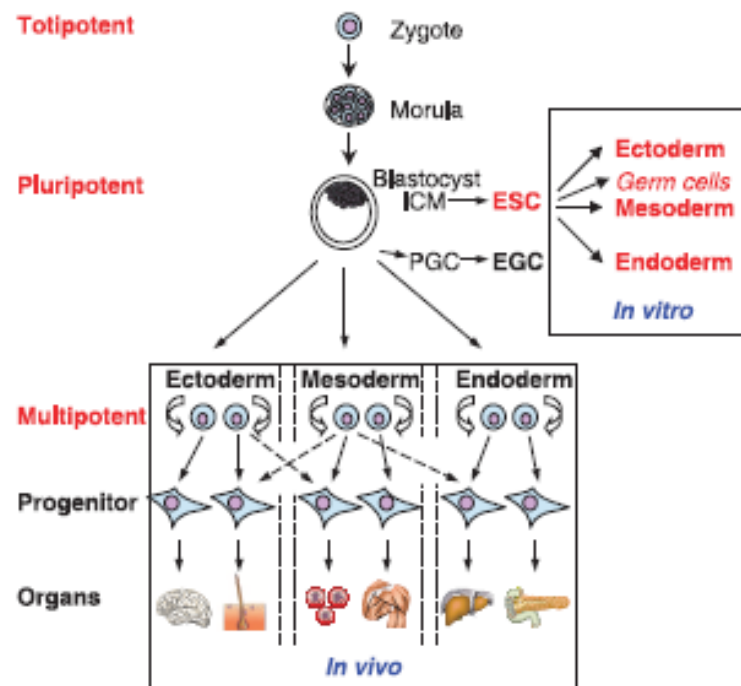


Figura 1 – Origem e classificação das células estaminais embrionárias ao longo do desenvolvimento embrionário (Adaptado de Wobus, 2005).

O zigoto tem a capacidade de dar origem às três camadas germinativas (endoderme, mesoderme e ectoderme) bem como aos tecidos extraembrionários, sendo designado totipotente. As células estaminais pluripotentes perdem a capacidade de originar os tecidos extraembrionários mas conservam a capacidade de originar as três camadas germinativas constituintes do embrião quer *in vivo* quer em cultura e mantêm a capacidade de auto-renovação. Células multipotentes tais como as células estaminais hematopoiéticas podem dar origem a todos os tipos celulares dentro de uma linha particular. As células unipotentes originam um tipo de células como por exemplo as espermatogónias que originam apenas espermatozóides (Gilbert, 2010).

1.1.1. Células estaminais embrionárias Vs Células estaminais adultas

Com base na sua origem e propriedades biológicas as células estaminais podem qualificar-se em células estaminais embrionárias ou em células estaminais adultas.

As células estaminais embrionárias existem apenas numa fase inicial de desenvolvimento embrionário e têm um potencial de diferenciação pluripotente. O blastocisto, como é então denominado, apresenta uma massa celular interna ou ICM (*inner cell mass*) localizada num dos pólos, que originará o embrião e da qual derivam as células estaminais embrionárias.

As células estaminias adultas são células indiferenciadas que retêm um potencial multipotente de diferenciação e que se encontram em diferentes tipos de tecidos. Têm também a capacidade de se auto-renovar ao longo da vida do organismo, permitindo a regeneração de tecidos e a manutenção da integridade dos tecidos - homeostasia (Zhang *et al.*, 2008).

Umas das mais estudadas e conhecidas são as células estaminais hematopoiéticas que originam todos os tipos de tecido de um organismo adulto. No entanto, não existe evidência de que estas células estaminais adultas isoladas sejam capazes de formar todos os tipos celular do organismo (National Institutes of Health, 2004).

1.1.2. Células estaminais embrionárias de murganho ou mESCs

Como foi referido as células estaminais embrionárias ou ESCs (*embryonic stem cells*) derivam da massa celular interna (ICM) do blastocisto. As primeiras linhas de células

estaminais embrionárias derivaram de ICM do blastocisto de murganho e foram propagadas com o auxílio de *mouse embryonic fibroblasts* (MEFs) (Evans e Kaufman 1981; Martin, 1981). Estas células são pluripotentes e são capazes de dar origem às três diferentes camadas germinativas embrionárias, nomeadamente, endoderme, mesoderma e ectoderme, que pode ser demonstrado *in vitro* através da formação de corpos embrioides (Verfaillie, 2009) ou *in vivo* quer seja pela formação de teratocarcinomas quando injectadas num murganho (Yu e Thomson, 2008) quer seja através da geração de quimeras (Verfaillie, 2009). Quimeras são obtidas através da injeção de células estaminais embrionárias derivadas da ICM de um blastocisto na cavidade de outro blastocisto, esta combinação origina uma mistura de tecidos e órgãos pertencentes quer às células estaminais do dador quer ao blastocisto receptor (National Institutes of Health, 2004).

As células estaminais embrionárias possuem uma elevada capacidade de proliferação *in vitro*, podendo ser mantidas por um longo período de tempo (Wobus *et al.*, 2005).

A fim de caracterizar as células estaminais para efeitos de pesquisa, várias estratégias têm sido desenvolvidas. A definição de célula estaminal embrionária é muito mais abrangente que a definição com base nos critérios de auto-renovação e diferenciação. A identificação de marcadores de superfície e moleculares tem vindo a ser útil na definição de célula estaminal. É hoje aceite que as células estaminais embrionárias indiferenciadas de murganho apresentem antigénios específicos de superfície (SSEA-1), que possuam actividade enzimática para a fosfatase alcalina e para a telomerase (Wobus *et al.*, 2005). Para além disso, é importante notar que as células estaminais embrionárias de murganho e humanas diferem no que diz respeito a alguns marcadores e factores de crescimento necessários para a manutenção da auto-renovação (Tabela 1).

Morfológicamente tanto as ESC humanas (hESC) como as de murganho (mESC) apresentam colónias compactas com bordos definidos. No entanto, as células de murganho têm uma forma arredondada enquanto as humanas apresentam uma forma achatada (National Institutes of Health, 2004).

Tabela 1 – Diferenças e semelhanças entre células estaminais embrionárias de murganho (mESC) e humanas (hESC).

Características	mESC	hESC
Marcadores celulares de superfície		
SSEA-1	+	-
SSEA-3/-4	-	+
TRA-1-60	-	+
TRA-2-54	-	+
GCTM-2	-	+
Actividade da Fosfatase alcalina	+	+
Factores de transcrição		
Oct-4	+	+
Nanog	+	+
Sox-2	+	+
Actividade da Telomerase	+	+
Factores de crescimento necessários		
LIF	+	-
bFGF	-	+
Potencial de diferenciação		
Formação de corpos embrioides	+	+
Formação de teratoma in vivo	+	+

1.1.3. Reguladores intrínsecos da pluripotência

O estado indiferenciado das células estaminais embrionárias é caracterizado pela presença de marcadores celulares específicos, nomeadamente Oct4, Sox2 e Nanog, factores de transcrição envolvidos, quer na manutenção da auto-renovação, quer na pluripotência. Um dos factores de transcrição mais bem caracterizados é o Oct4, que pertence à classe POU e regula a transcrição génica pela capacidade de reconhecer a sequência de DNA ATGCAAAT (Desojez e Zwaka, 2012). Durante o desenvolvimento embrionário a expressão deste factor ocorre exclusivamente no oócito, nos blastómeros, na massa celular interna do blastocisto e na linha germinal. A presença deste factor é essencial para manutenção da pluripotência, *in*

vivo, *in vitro* ou ainda para a reprogramação epigenética, visto que o nível de expressão de Oct4 pode ditar o programa de desenvolvimento celular (Figura 2). Na sua ausência, as mESCs diferenciam-se em células da trofotoderme (Nichols *et al.*, 1998) mas quando aumentada a sua expressão para o dobro, as mESCs diferenciam-se em células da mesoderme e ectoderme (Niwa *et al.*, 2000; Chambers, 2004) (Figura 2).

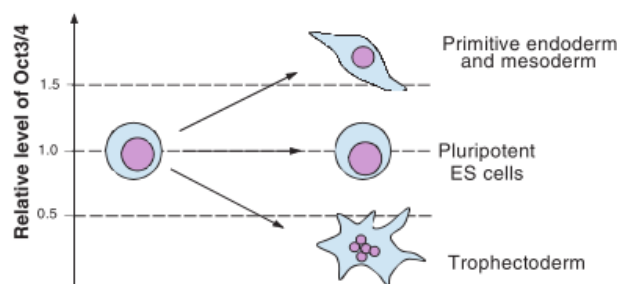


Figura 2— A expressão relativa do nível de Oct-4 determina o destino das células estaminais (Adaptado de Wobus *et al.*, 2005).

Vários estudos demonstram que o Oct4 interage com diversos outros factores transcricionais como Sox2, Sall4, Hdac2, Sp1, Nanog, Dax1 entre outros (van den Berg *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2008). Estas interações podem levar à formação de diferentes complexos proteicos que se regulam entre si, o que pode explicar, de algum modo, a existência de diferentes estados de pluripotência (Desojev e Zwaka, 2012).

O Oct4 forma um heterodímero com o Sox2 que é requerido para a formação do epiblasto (que é formado a partir da ICM e dá origem ao embrião), mas a perda de Sox2 leva à formação da trofotoderme (Avilion *et al.*, 2003). O factor de transcrição Sox2 (*SRY-related high mobility group box*) pertence ao subgrupo Sox B1 que codifica um único domínio HMG de ligação ao DNA. Ao contrário dos factores Oct4 e Nanog, a expressão de Sox2 permanece nas células da endoderme extraembrionária e nas células precursoras do sistema nervoso central, e o seu silenciamento afecta um estágio de desenvolvimento mais tardio, possivelmente devido a uma forte contribuição de Sox2 maternal (Masui *et al.*, 2007; Avilion *et al.*, 2003).

Outro factor importante na regulação e manutenção da pluripotência em células estaminais é o Nanog, cujo domínio de ligação ao DNA é um homeodominio. A sobre-expressão desta proteína em células estaminais embrionárias permite manter a capacidade de auto-renovação na ausência do factor de crescimento *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF), visto que esta ausência em condições normais leva as células estaminais a diferenciar (Chambers *et al.*, 2003; Mitsui *et al.*, 2003). A deleção de Nanog leva a que as células do interior do blastocisto não mantenham a sua pluripotência diferenciando-se em células da endoderme

primitiva (Mitsui *et al.*, 2003). E a diminuição da expressão de Nanog leva à diferenciação de células pluripotentes (Pan *et al.*, 2007).

Tal como o Oct4, o Nanog interage com várias proteínas incluindo Smad1, Small3, Nr0b1, Nac1, Sp1 entre outros (Desojez e Zwaka, 2012). *In vitro*, Nanog está presente nas linhas celulares pluripotentes como células estaminais embrionárias, germinativas e de carcinomas embrionários, contudo não está presente nos tecidos adultos (Pan *et al.*, 2007). A relevância deste factor tem vindo a ser documentada por vários grupos, sendo mesmo considerada a reguladora mestre da pluripotência de células estaminais embrionárias (Pan *et al.*, 2007; Chambers *et al.*, 2007).

1.1.4. Reguladores extrínsecos da pluripotência

As células estaminais embrionárias de murganho podem ser mantidas em cultura num estado proliferativo e indiferenciado com a presença de fibroblastos inactivos mitoticamente (Evans e Kaufman, 1981; Martins, 1981). Contudo este sistema de cultura é desnecessário se o meio for suplementado com LIF. Embora ainda não seja claro o modo de actuação do LIF com a rede transcricional intrínseca de pluripotência – nomeadamente Oct4, Nanog e Sox2 – sabe-se que tem um papel importante na manutenção da auto-renovação de mESC através da activação da via Stat3 (*Signal Transducer and activator of transcription 3*) (Yu e Thomson, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Chambers, 2004). O LIF é membro da família de citocinas interleucina-6 e o seu efeito é mediado através de um complexo heterodimérico composto por uma cadeia receptora específica de LIF de baixa afinidade (LIFR) e pela proteína gp130 (Desojez e Zwaka, 2012). A ligação do LIF induz a dimerização dos receptores, que por seu turno activam três vias: a) a via JAK (*Janus-associated tyrosine kinase*)/Stat3 ; b) a via PI3K-AKT e c) a via MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)/Erk (Figura 3) (Niwa *et al.*, 1998; Niwa *et al.*, 2009). Apesar das vias de sinalização PI3K-AKT e MAPK/Erk poderem ser activadas através de múltiplos sinais, a via JAK/Stat3 é regulada exclusivamente pelo LIF. A activação de JAK resulta na fosforilação do factor de transcrição Stat3 que promove a sua dimerização e translocação para o núcleo, onde o dímero actua como activador transcricional de genes relacionados com a pluripotência (Paling, 2004). Um dos alvos do Stat3 é o factor de transcrição c-myc que está envolvido na proliferação, na regulação do ciclo celular, no crescimento e na diferenciação (Schmidt, 1999).

O bloqueio da via JAK ou uma mutação que origine gp130 truncado em mESC leva a uma diminuição da actividade de Stat3 e consequentemente resulta na diferenciação das células estaminais (Ernst *et al.*, 1999; Niwa *et al.*, 1998). Esta diferenciação, na ausência de LIF,

dá origem a uma população de células que expressam genes característicos da mesoderme e endoderme (Figura 3) (Niwa *et al.*, 2000).

Em 2003, Ying e colaboradores verificaram que, em meio sem soro, o LIF é insuficiente para prevenir a diferenciação das mESCs, mas em conjunto com o factor BMP (*bone morphogenetic protein* – membro da família TGF β) as células mantêm a capacidade de auto-renovação. Contudo a actividade de BMP por si só, através da indução da expressão das proteínas inibidoras de diferenciação (Id – do inglês *inhibitor of differentiation*) através da via Smad, não é suficiente para a manutenção da auto-renovação das células estaminais embrionárias (Ying *et al.*, 2003).

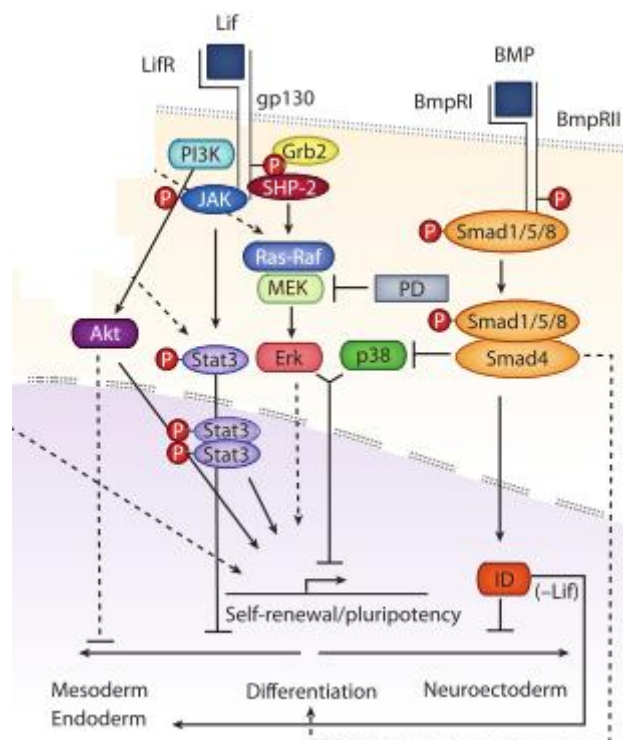


Figura 3 – Vias de sinalização que regulam a pluripotência de células estaminais embrionárias de murgancho (mESCs). Adaptado de Desojez e Zwaka, 2012.

1.2. Mitocôndria e Metabolismo

Em células eucarióticas as mitocôndrias desempenham um papel fundamental, devido quer à sua participação em reacções metabólicas chave, quer à síntese da maioria do ATP necessário, ou à regularização de várias cascatas de sinalização incluindo a apoptose (Dimmer, 2006). Em termos estruturais este organelo contém duas membranas que separam quatro compartimentos distintos: a membrana externa, o espaço intermembranar, a membrana interna e a matriz. A membrana interna possui dobras que se designam por cristas, aumentando assim a sua área de superfície, que abriga a cadeia transportadora de electrões e a ATP sintetase e delimita a matriz mitocondrial (Lehninger, 2005). A mitocôndria apresenta diferentes formas e tamanhos que podem variar no mesmo tipo celular bem como dentro da mesma célula (Detmer *et al.*, 2007). Ao contrário do que se pensava inicialmente, a mitocôndria tem uma estrutura dinâmica regulada por fissão, fusão e motilidade (McBride *et al.*, 2006). Estes mecanismos de fissão e fusão consistem em movimentos de aproximação ou afastamento entre duas mitocôndrias ao longo de faixas que levam à sua separação ou junção, numa das suas extremidades, respectivamente (Chan, 2006). Disfunções na mitocôndria podem ainda estar associadas com uma série de patologias como por exemplo doenças metabólicas, diabetes, cancro, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, obesidade e ainda envelhecimento (Gregersen *et al.*, 2012).

1.2.1. Produção de energia: Fosforilação oxidativa vs glicólise

A mitocôndria é conhecida por ser a maior fornecedora de ATP da célula. Este ATP pode ser usado para várias funções celulares incluindo síntese proteica, transporte vesicular, secreção de metabolitos entre outros. A maquinaria mitocondrial responsável pela produção de energia é composta por diversas proteínas, designando-se cadeia respiratória mitocondrial ou cadeia transportadora de electrões, e localiza-se na membrana interna da mitocôndria. A transferência de electrões ocorre entre vários complexos de acordo com o seu potencial redox para um aceitador final, o oxigénio. Esta transferência de electrões gera também um gradiente de protões cuja energia é utilizada para sintetizar ATP. A cadeia respiratória é composta por quatro complexos proteicos (Figura 4), o complexo I (NADH-Ubiquinona Redutase), o complexo II (Succinato-Ubiquinona Redutase), o complexo III (Ubiquinol-citocromo c Redutase), o complexo IV (Citocromo c Oxidase), pela ATP sintetase que muitas vezes é

denominada por complexo V, e por duas proteínas de transporte de electrões, a Ubiquinona e o Citocromo c.

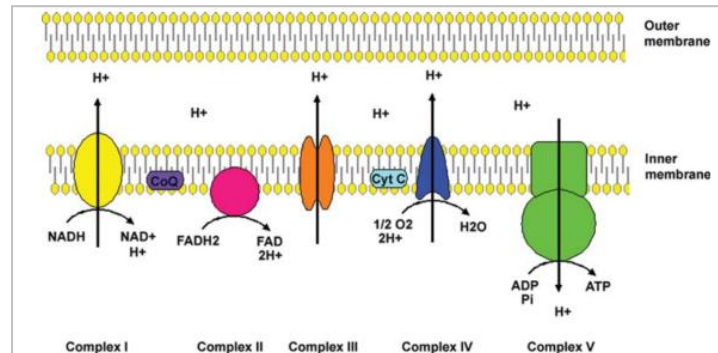


Figura 4 – Imagem representativa da cadeia transportadora de electrões mitocondrial que é composta por cinco complexos e dois transportadores de electrões que estão na membrana interna mitocondrial (Adaptado de St. John *et al.*, 2010).

O complexo I e II aceitam os electrões do NADH e FADH₂ respectivamente, entregando-os posteriormente à ubiquinona. A ubiquinona reduzida transfere os electrões para o complexo III que por sua vez faz o mesmo com a proteína transportadora extrínseca citocromo c. O destino final é o complexo IV que recebe os electrões do citocromo c e os entrega ao oxigénio, formando água. Este transporte de electrões promove o bombeamento de H⁺ para o espaço intermembranar. O fluxo do H⁺ a favor do gradiente de concentração, ou seja, do espaço intermembranar para a matriz, é mediado por ATP sintetases, que utilizam a energia deste transporte para fosforilar ADP (adenosina difosfato) e formar ATP (adenosina trifosfato). Esta distribuição desigual de prótons e cargas eléctricas através da membrana representa uma importante forma de energia potencial, designada por força protomotiva, e é formada por duas componentes: uma eléctrica ($\Delta\Psi_m$) e outra dependente do pH (ΔpH) (Lehninger, 2005).

A glicólise consiste numa série de dez reacções metabólicas na qual uma molécula de glicose é convertida por diferentes enzimas a duas moléculas de piruvato. Esta via pode ser dividida em duas fases distintas (Figura 5). A primeira consiste em cinco reacções, onde na primeira ocorre a activação da molécula de glicose através da sua fosforilação, com recurso a uma molécula de ATP. Esta fosforilação é feita pela enzima hexoquinase (HK). A glucose 6-fosfato é convertida pela fosfoglucose isomerase a frutose 6-fosfato e esta dá origem a frutose 1,6-fosfato com o auxílio da enzima fosfofrutoquinase e com gasto de uma molécula de ATP. A frutose 1,6-fosfato é convertida a dihidroxiacetona e gliceraldeído 3-fosfato através das reacções catalisadas pelas enzimas aldolase e triosefosfato isomerase, respectivamente.

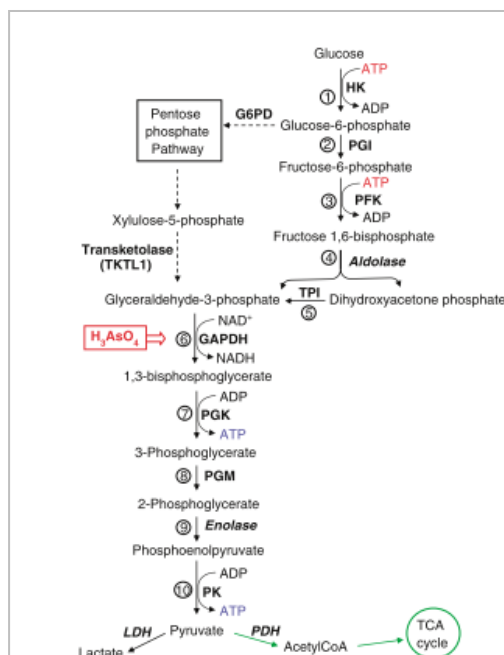
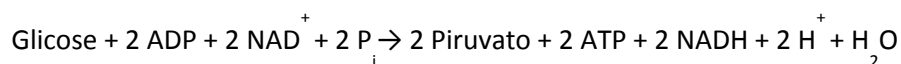


Figura 5 – Via glicolítica (Adaptado de Pelicano *et al.*, 2006).

Na segunda fase ocorre oxidação da molécula gliceraldeído 3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato através da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e com redução de NAD^+ a NADH . A 1,3-bisfosfoglicerato é convertida, pela fosfofrutoquinase e com produção de uma molécula de ATP, a 3-fosfoglicerato. Este por sua vez origina 2-fosfoglicerato e consequentemente fosfoenolpiruvato através das reacções catalisadas pelas enzimas fosfoglicerato mutase e enolase, respectivamente. Por fim, o fosfoenolpiruvato é convertido a piruvato pela piruvato quinase produzindo outra molécula de ATP. Este piruvato pode ser convertido, na ausência de oxigénio, em lactato pela lactato desidrogenase ou pode ser convertido, em condições aeróbias, a acetil-CoA pela piruvato desidrogenase e ser posteriormente oxidado a dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O) na mitocôndria através de ciclo do ácido tricarboxílico e da cadeia transportadora de electrões.

A oxidação parcial da glicose pela via glicolítica pode ser sumarizada pela seguinte equação:



Como a Figura 5 mostra, cada reacção na via glicolítica é catalizada por uma enzima específica, no entanto, para além das suas actividades enzimáticas vários estudos demonstram que estas enzimas são multifuncionais (Pelicano *et al.*, 2006).

Em suma na primeira fase 2 moléculas de ATP são utilizados para converter a glucose em 2 moléculas de gliceraldeído-3-fosfato. Na segunda fase, o gliceraldeído 3-fosfato é degradado em piruvato e a energia libertada, por essas reacções, é conservada através da redução de duas moléculas de NAD^+ a NADH e através da produção de quatro moléculas de ATP, o que gera um saldo positivo de 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucose.

A completa oxidação de 2 moléculas de piruvato, através do complexo multienzimático da piruvato desidrogenase, do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e da cadeia transportadora de electrões, o rendimento total é de 36 ou 38 (somando com a glicólise) moléculas de ATP obtidos pela oxidação completa de 1 molécula de glucose em CO_2 e H_2O (Lehninger, 2005; Metzler, 2004).

1.2.2. O papel da mitocôndria em células estaminais embrionárias

Alguns estudos têm vindo a documentar a importância deste organelo na preimplantação dos embriões bem como nas células estaminais embrionárias, contudo algumas questões permanecem por responder.

Considerando que as ESC derivam da ICM do blastocisto, é expectável que apresentem um perfil metabólico e morfológico semelhante. Estudos recentes demonstraram que células estaminais indiferenciadas pluripotentes, quer de murganho quer de humanas, dispõem de um número pequeno de mitocôndrias que estão colocadas em conjuntos perinucleares e que têm cristas pouco desenvolvidas com baixos níveis de fosforilação oxidativa (St John *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2006; Facucho-Oliveira *et al.*, 2007; Ramalho-Santos *et al.*, 2009; Rehman, 2011). Além disso, tanto as mESCs como as hESCs expressam níveis elevados de enzimas glicolíticas e demonstram ter um elevado fluxo glicolítico que suporta a proliferação das células estaminais (Chung *et al.*, 2007; Kondoh *et al.*, 2007). Estes resultados indicam que as células estaminais conseguem sobreviver eficientemente em condições anaeróbias. Ezashi e colaboradores comprovaram que o ambiente hipóxico previne a diferenciação espontânea das hESCs (Ezashi *et al.*, 2005).

Na diferenciação, as mitocôndrias de mESCs e de hESCs desenvolvem inúmeras cristas e uma rede dinâmica de túbulos em oposição às mitocôndrias individuais com formato oval e em pequeno número das ESC pluripotentes (St John *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2006; Chung *et al.*, 2007). Esta alteração na morfologia mitocondrial é acompanhada por elevadas taxas de consumo de oxigénio, aumento do potencial membranar e aumento da produção de ATP através da fosforilação oxidativa (Cho *et al.*, 2006; Chung *et al.*, 2007). Consequentemente, a

expressão de enzimas glicolíticas e a produção de lactato é reduzida significativamente quando comparado com o estado de pluripotência (Chung *et al.*, 2007; Ramalho-Santos *et al.*, 2009, Varum *et al.*, 2011). Estes eventos estão relacionados com a activação do metabolismo aeróbico parecem levar à perda de pluripotência e indicam que a mitocôndria tem um papel importante na diferenciação (Mandal *et al.*, 2011; Facucho-Oliveira *et al.*, 2009). Assim, a preservação da mitocôndria imatura em células estaminais embrionárias pode levar à manutenção do estado de pluripotência e auto-renovação e por isso deve ser considerado um marcador de células estaminais (Lonergan *et al.*, 2006). Estas propriedades mitocondriais também se encontram nas células estaminais adultas, mais precisamente em células estaminais hematopoiéticas humanas (Piccoli *et al.*, 2005) e células estaminais mesenquimais humanas (Chen *et al.*, 2008).

1.2.3. Espelho do metabolismo celular

Do metabolismo celular provém a bioenergética e os requisitos de síntese/degradação necessários para suportar as funções celulares. Nas células estaminais o metabolismo recai preferencialmente no uso da glicólise como fonte de energia devido não só à imaturidade das mitocôndrias como também ao pouco oxigénio disponível (hipóxia). Esta característica, bem como as características relativas à proliferação ilimitada e a capacidade de diferenciação em tecidos específicos, são partilhadas também pelas células cancerígenas (Kopper *et al.*, 2004; Costello *et al.*, 2005).

As células cancerígenas exibem diferentes requerimentos metabólicos relativamente à maioria das células diferenciadas normais. A primeira alteração específica no metabolismo de células tumorais foi descrita em 1926 por Warburg e seus colaboradores no qual identificam a glicólise como fonte principal de ATP (Warburg, 1956). Este fenótipo bioquímico é designado por efeito de Warburg e traduz-se numa elevada metabolização da glucose em ácido láctico mesmo na presença de oxigénio (condições aeróbias). Warburg sugeriu que esta glicólise aeróbica tinha como causa danos na mitocôndria (Warburg, 1956). Contudo, na última década alguns estudos sugeriram que este efeito era devido a alterações nas vias de sinalização que regulam a entrada de glucose e a sua metabolização (Kim *et al.*, 2007; Keith *et al.*, 2007). Algumas destas alterações podem ser em várias vias entre elas a do factor que induz a apoptose (HIF- *hypoxia inducible factor*), a via AKT ou ainda através do oncogene MYC (Dang *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2005; Gogvadze *et al.*, 2008; Cairns *et al.*, 2011). Como resposta adaptativa as células exibem um aumento de transportadores de glucose, um aumento da

expressão de enzimas glicolíticas como a hexoquinase ou a lactato desidrogenase e a activação de factores angiogénicos entre outros (Kim *et al.*, 2005; Gogvadze *et al.*, 2010; Cairns *et al.*, 2011).

A hexoquinase, que catalisa irreversivelmente a primeira reacção da via glicolítica, apresenta quatro isoformas nos diferentes tecidos, sendo a hexoquinase I e II as mais expressas em células cancerígenas (Mathupala *et al.*, 2006; Gogvadze *et al.*, 2010). Para além disso, estas isoformas têm também a capacidade de se ligar directamente à mitocondria (Bustamente, 1977). A interacção com o canal proteico da membrana externa VDAC (*Voltage-dependent anion channel*) (Figura 6) permite à hexoquinase o uso exclusivo do ATP que é formado intramitocondrialmente para fosforilar a glucose mantendo assim uma elevada taxa glicolítica e permite escapar à inibição pela glucose 6-fosfato (Mathupala *et al.*, 2009). Por outro lado, a interacção hexoquinase-VDAC parece ser crítica para a prevenção da indução de apoptose (Pastorino *et al.*, 2002; Azoulay-Zohar *et al.*, 2004) pois a disrupção da ligação HK-VDAC pela mutagénese de aminoácidos chave no canal VDAC, aumentou a indução apoptótica em tumores (Zaid *et al.*, 2005).

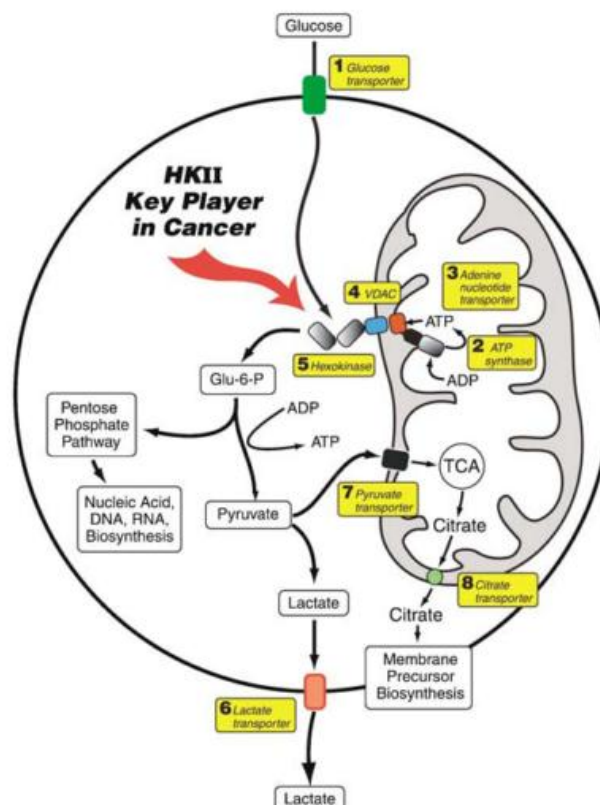


Figura 6 – Entrega de glucose e ATP à hexoquinase II em células cancerígenas e os destinos metabólicos da glucose-6-fosfato. A glucose entra através dos transportadores de glucose (1) e é rapidamente fosforilada pela hexoquinase (5) ligada a VDAC (4) que se localiza na membrana externa, permitindo o acesso directo ao ATP

gerado pela ATP sintetase (2) e transportado pelo transportador de nucleótidos de adenosina (3) (Adaptado de Mathupala *et al.*, 2006).

Como já foi referido a mitocôndria tem um papel crucial na via intrínseca apoptótica visto que este organelo liberta citocromo c e outros factores necessários para a activação da morte celular com participação das famílias de proteínas anti apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W) e pro apoptóticas (BAX, BAD, BOK, BIM, BAK, BID) (Dimmer *et al.*, 2006).

Apesar do mecanismo pelo qual esta interacção Hexoquinase-VDAC previne a morte celular não ser ainda claro, alguns estudos sugerem que as actividades das proteínas anti apoptóticas Bcl-XL e Bcl-2 podem actuar para promover a conformação fechada do canal VDAC (Shimizu *et al.*, 2000) ou podem actuar para estabilizar a conformação aberta, restaurando as trocas metabólicas através da membrana mitocondrial externa, impedindo a libertação de citocromo c (Vander Heiden *et al.*, 1999; Majewski *et al.*, 2004).

A hexoquinase II (HKII) não é o único exemplo de enzimas glicolíticas que regulam a sobrevivência das células cancerígenas. A gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) também se encontra sobre-expressa em vários tipos de cancro (Colell *et al.*, 2009). Alguns estudos evidenciam o papel desta enzima na indução de apoptose. Tarze e colaboradores mostraram que GAPDH facilita a apoptose através da permeabilização da membrana mitocondrial e consequentemente através da libertação de citocromo c (Tarze *et al.*, 2007). Contudo, a GAPDH nitrosilada nuclear participou na degradação de proteínas necessárias para a indução de apoptose (Hara *et al.*, 2005). Apesar de fazer parte da via glicolítica, esta enzima tem também uma função reguladora na vida e na morte de células transformadas.

1.3. 3-Bromopiruvato

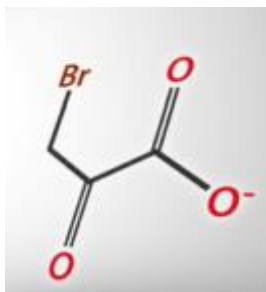


Figura 7 – 3-bromopiruvato (Adaptado de Ko *et al.*, 2012)

Análogo do piruvato, o ácido 3-bromopirúvico (3-BrPA) possui características químicas singulares e tem despertado interesse por ser um agente alquilante capaz de reagir com o grupo tiol e hidroxilo de várias enzimas. Esta propriedade foi sugerida inicialmente por Fonda e DeGrella (Fonda e DeGrella, 1974) e mais tarde por Meloche e colaboradores (Meloche et al., 1978), apesar de já em 1969 ter sido divulgada a capacidade do 3-BrPA em regular a actividade enzimática (Baker e Rabin, 1969).

A crescente evidência da sua capacidade em inibir várias enzimas contribuiu para que fosse considerado um presumível agente anti-tumoral. Esta evidência foi descrita pela primeira vez em 2002, quando Geschwind e colaboradores demonstraram que o efeito do 3-BrPA, em ratos com tumor implantado no fígado, foi eficaz na indução da morte celular na maioria das células cancerígenas (Geschwind *et al.*, 2002). A confirmação destes resultados surgiu mais tarde em modelos *in vivo* e com um efeito anti-tumoral massivo mas com pouco ou nenhum efeito concomitante em células não tumorais (Ko *et al.*, 2004).

Este composto tem vindo a ser descrito como sendo um inibidor potente, da hexoquinase II, através de modificações dos resíduos de cisteína (Chen, *et al.*, 2009; Mathupala *et al.*, 2009), e da GADPH (Dell'Antone, 2009; Ganapathy-Kanniappan *et al.*, 2009; da Silva *et al.*, 2009) na via glicolítica, bem como da succinato dehidrogenase (da Silva *et al.*, 2009), do retículo endoplasmático (Ganapathy-Kanniappan *et al.*, 2010) e lisossomas (Dell'Antone, 2006). Contudo, o mecanismo de acção responsável pela actividade anticancerígena permanece por definir na totalidade (Cardaci *et al.*, 2012).

1.3.1. Efeitos do 3-bromopiruvato em células cancerígenas e noutros tipos celulares

O 3-bromopiruvato é um composto que tem vindo a ser descrito como um potencial agente anti-cancerígeno logo tem vindo a ser estudado em diferentes células cancerígenas, não existindo até ao momento estudos em células estaminais.

Está bem documentado que a morte celular de células cancerígenas induzida através do tratamento com 3-bromopiruvato depende da depleção do ATP celular (Ko *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2005; Pelicano, 2006). Associado a esta depleção através da inibição da enzima hexoquinase, foi demonstrado que o 3-bromopiruvato induziu a apoptose em linhas celulares de leucemia e linfoma pela desfosforilação da proteína pro-apoptótica BAD na Ser-112, que leva à re-localização de Bax e à libertação do citocromo c (Xu *et al.*, 2005). No entanto, Qin e

colaboradores demonstraram que o 3-bromopiruvato a induz necrose em melanoma (Qin *et al.*, 2010).

Estudos *in vitro* têm demonstrado a inibição da hexoquinase II por 3- bromopiruvato. Chen e colaboradores demonstraram que este composto (100µM, 3-6h) causou, em linhas celulares de linfoma e leucemia, a dissociação da enzima glicolítica hexoquinase II da mitocôndria levando à libertação do factor indutor de apoptose (AIF – apoptosis-inducing factor) para o citosol e consequentemente à morte celular (Chen *et al.*, 2009). Num estudo focado na actividade celular em hepatocarcinoma foi demonstrado que o tratamento com 3-BrPA numa gama de concentrações de 150-5000µM por 30 min teve um efeito inibitório reduzido mas que 100µM levou a uma perda substancial de viabilidade celular (da Silva *et al.*, 2009). Ihrlund e colaboradores combinaram 25µM de 3-BrPA com pequenas doses de cisplatina e obtiveram morte celular mais evidente (necrose em particular) (Ihrlund *et al.*, 2008).

Outros estudos relatam a inibição de GAPDH por 3-BrPA. As fracções citosólicas de fígado de rato foram tratadas com 3-BrPA e de entre as várias enzimas glicolíticas estudadas, incluindo a HKII, a GAPDH foi a mais inibida com 150µM durante 30min (da Silva *et al.*, 2009). Verificou-se também que o agente anti-tumoral actuava directamente na enzima GAPDH através da piruvilação e que esta modificação afectava negativamente a GAPDH na sua função e ajudava na morte celular (Ganapathy-Kanniappan *et al.*, 2009).

O piruvato é o produto final da glicólise e é normalmente convertido pelo complexo piruvato desidrogenase (PDC), cujo principal componente catalítico é a piruvato desidrogenase (PDH), em acetil-CoA para posterior metabolização no ciclo de Krebs. Alguns estudos mostraram que o 3-bromopiruvato inibiu esta enzima. Usando uma linha knockout para PDC de murganho, Korotchkina e colaboradores inibiram a piruvato desidrogenase (PDH) com 6 µM de 3-bromopiruvato (Korotchkina *et al.*, 1999). Noutro estudo, Kumar e colaboradores mostraram que este composto inibiu a piruvato desidrogenase de espermatozóides de hamster (Kumar *et al.*, 2008).

Em linha com o facto de ser mimético do piruvato, o 3-bromopiruvato serve de substrato para a lactato desidrogenase (LDH) que normalmente converte o piruvato a lactato (Dell'Antone, 2009).

Em linhas celulares de melanoma foi demonstrado que o 3-BrPA induziu a geração de espécies reactivas de oxigénio, baixou os níveis de glutathione, levou à perda da permeabilização da membrana externa e levou à depleção de ATP, consequentemente levou à

morte celular por necrose (Qin *et al.*, 2010). No caso do cancro da mama, o 3-BrPA a 25µg/ml inibiu significativamente a proliferação celular (Liu *et al.*, 2009).

Mais recentemente, num estudo feito em hepatoma foi descrito que o 3-BrPA inibiu o potencial membranar, o consumo de oxigénio, a actividade da enzima succinato desidrogenase e a ligação da hexoquinase à mitocôndria (Rodrigues-Ferreira *et al.*, 2012).

1.4. Objectivos

Vários estudos revelam a capacidade do composto 3-bromopiruvato em inibir vários alvos metabólicos, nomeadamente relacionados com a glicólise, no entanto não são conhecidos ainda todos os seus efeitos.

Considerando que as células estaminais apresentam características metabólicas semelhantes às de células cancerígenas, um dos objectivos principais deste trabalho é verificar o efeito do 3-bromopiruvato na pluripotência, estudando os reguladores intrínsecos. O outro objectivo principal é perceber o efeito do agente anti-tumoral no metabolismo das células estaminais embrionárias de murganho, quer através da avaliação de algumas enzimas glicolíticas quer através do estudo de alguns parâmetros mitocondriais.

Material e Métodos

Capítulo 2

2.1. Material

Quando não especificado o material foi adquirido à Sigma- Aldrich.

2.2. Cultura de células

Meios e soluções de culturas celulares

- PBS (*Phosphate buffer saline*)
- Meio Knockout-DMEM

82% *Knockout Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (Gibco® Life Technologies)

15% *knockout Serum Replacer* (Gibco® Life Technologies)

1% MEM Non-Essential Amino Acids (Sigma-Aldrich)

1% Penicilina/Estreptomicina

1% L-glutamina (2mM)

β Mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) - Por cada 500ml de meio adicionavam-se 3,5μl de β Mercaptoetanol.

A linha celular usada para este estudo foi E14, linha que em termos de cariótipo são do gênero masculino, e foram cedidas por Miguel Ramalho-Santos (UCSF, EUA).

Esta linha celular foi cultivada em meio Knockout-DMEM, suplementado com KSR (*knockout Serum Replacer*), com aminoácidos, com solução antibiótica (Penicilina/ Estreptomicina), com L-glutamina e β Mercaptoetanol.

Plaqueamento de mESCs

Os poços das placas de 6 foram revestidos com gelatina a 0,1% (Sigma-Aldrich) e incubados durante 10 min a 37°C. Posteriormente o excesso a gelatina foi removida e foi adicionado às placas meio Knockout-DMEM com LIF (ESGRO®) a 1,5μl/ml, 2ml em cada poço. As células estaminais embrionárias de murganho (mESC) foram descongeladas, transferidas para um falcon de 15ml e diluídas em 7 ml de meio Knockout-DMEM. Procedeu-se a uma

centrifugação (5min a 1200rpm) em que o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 1200µl de meio. Foram adicionados 200 µl da suspensão celular a cada poço. As células foram incubadas por um período de 12 a 16h para permitir a sua adesão e após este período o meio foi renovado diariamente.

Dissociação das mESCs

As mESCs foram mantidas em meio Knockout-DMEM com LIF a 1,5µl/ml a 37°C, 5% CO₂ e 19% de O₂ até se proceder à passagem das mesmas. O meio foi removido e as mESCs foram lavadas com PBS. A dissociação foi feita enzimaticamente com a enzima accutase durante 5 min, a 37°C. De modo a inactivar a acção da enzima foi adicionado 5x o volume de meio de cultura relativamente ao volume de enzima. O meio contendo as células foi sujeito a uma centrifugação de 5 min a 1200rpm, no qual o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em meio fresco. Da suspensão celular retiraram-se 10µl para contagem na câmara de Neubauer para posterior cálculo da densidade. Foi adicionada a suspensão celular às novas placas, revestidas previamente com gelatina e após a remoção desta, coberta com meio Knockout-DMEM com LIF (ESGRO®) a 1,5µl/ml.

Tratamento das mESc com 3-Bromopiruvato

A droga usada neste estudo foi 3- bromopiruvato que foi adicionada logo após a passagem das células. O meio foi mudado diariamente (bem como a droga) até perfazer as 62h de incubação.

As concentrações utilizadas foram de 5, 10, 25 e 50 µM. Foram realizados dois controlos, sendo um deles o controlo sem o tratamento com a droga e o outro sem o tratamento com a droga e sem o factor de pluripotência (LIF).

2.3. Ensaio de viabilidade das mESCs

A análise do efeito do 3-bromopiruvato na viabilidade celular das células estaminais embrionárias de murganho (mESCs) foi feita com o kit LIVE/DEAD® Invitrogen. Este kit contém duas sondas, SYBR® 14 e IP (iodeto de propídio), que foram preparadas em DMSO.

O SYBR® 14 liga-se aos ácidos nucleicos, e sendo permeável à membrana cora todas as células. A fluorescência que emite é de cor verde. O iodeto de propídio é um marcador nuclear,

penetra exclusivamente nas células que têm a membrana celular danificada permitindo por isso a identificação das células mortas, emitindo assim fluorescência vermelha.

A incubação das células com as diferentes concentrações de 3-BrPA foi feita a 37°C durante 24h, 48h e 62h. Após cada tratamento, as células foram lavadas com PBS, dissociadas com accutase, centrifugadas a 1200rpm por 5min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em PBS. De seguida as células foram incubadas com as sondas IP (iodeto de propídio) e SYBR® 14 por 20 min a 37°C pertencentes ao kit LIVE/DEAD® Invitrogen.

2.4. Ensaio da actividade metabólica das mESCs

Este método avalia a actividade metabólica das células quantificando a redução metabólica do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) por desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH, no que resulta a produção de cristais de formazano, de coloração púrpura, no interior das células (Berridge *et al.*, 2005). Estes podem ser observados ao microscópio ou extraídos e dissolvidos com solventes orgânicos, como por exemplo o DMSO ou isopropanol, permitindo a sua quantificação através da espectrofotometria.

As células foram incubadas com as diferentes concentrações de 3-BrPA a 37°C durante 24h, 48h e 62h. Após cada tratamento, as células foram lavadas com PBS e foi adicionado 450µl de meio e 50µl de MTT (0,5mg/ml) durante 5h a 37°C. O meio foi recolhido e centrifugado a 1000g por 5min para recolha dos cristais não aderentes. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 300µl de isopropanol para dissolver os cristais. A leitura foi feita numa placa de 96 poços ELISA, nos comprimentos de onda de 570nm e 620nm.

2.5. Detecção do potencial membranal mitocondrial ($\Delta\psi_m$) por citometria de fluxo

A citometria de fluxo é um método utilizado para medir as propriedades das células em suspensão que, após serem especificamente marcadas com um corante fluorescente, são

orientadas em fluxo laminar e interceptadas individualmente através de um feixe de luz (laser).

O potencial mitocondrial membranar foi detectado usando a sonda fluorescente tetrametilrodamina (TMRM) (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as células foram crescidas e drogadas diariamente durante 62h. As células foram lavadas com PBS e a dissociação foi feita com accutase. De seguida foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em PBS. As células foram incubadas com 20µM de sonda TMRM por 20 minutos a 37°C. As amostras foram analisadas usando o citómetro de fluxo BD FACSCalibur. Aproximadamente 20000 células foram usadas para cada condição experimental. Para controlo positivo, foi usado o inibidor mitocondrial CCCP a 250µM. As células foram então centrifugadas a 1200rpm durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 250µl de PBS. A análise de dados foi feita pelo software Quest Pro Acquisition.

2.6. Análise do conteúdo de nucleótidos de adenosina em mESCs por *High-performance liquid chromatography* (HPLC)

Soluções

- *Solução de extracção*
0.6 M HClO₄

25mM EDTA-Na

- *Solução de neutralização*
3M KOH

1.5 M Tris

O ATP, ADP e AMP das mESC foram extraídos com o auxílio de ácido perclórico (0,6M) suplementado com EDTA-Na (25mM). As células foram centrifugadas a 14000 rpm por 2min a 4°C. O sobrenadante foi neutralizado com a adição de KOH (3M) em 1.5M de Tris e guardado a -80°C até ser utilizado. A quantificação de ATP, ADP e AMP foi feita através de HPLC em fase reversa de acordo com o protocolo descrito anteriormente (Stocchi *et al.*, 1985). O aparelho de cromatografia utilizado foi Beckman-system Gold que consiste de um modelo de bomba binário e um detector de UV controlados por um computador. A detecção de comprimento de

onda foi a 254nm e a coluna usada foi Lichrosphere 100 RP-18 (5mm) da Merck. Uma eluição isocrática com o tampão fosfato (100mM, KH₂PO₄, pH 6,5) e metanol a 1.0% foi feita a uma taxa de 1ml/min. A identificação dos picos determinados foi seguida através dos tempos de retenção standard. A carga energética foi determinada de acordo com a seguinte fórmula: $0,5 \times (\text{ADP} + 2 \times \text{ATP}) / (\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP})$.

2.7. Detecção dos níveis de lactato no meio extracelular

A quantificação de lactato foi feita utilizando o kit de ensaio do lactato (BioVision). Resumidamente, as células foram crescidas e drogadas diariamente durante 62h. Ao fim de 62h retirou-se, para um tubo com filtro, 700µl de meio e centrifugou-se a 14000rpm durante 2min. O sobrenadante ficou guardado a -80°C até ser utilizado.

Resumidamente, para a curva padrão utilizou-se o Standard de lactato a 0,1nmol/µl. Numa placa de 96 poços, foi pipetado em cada poço, 50µl da mistura de reacção contendo o padrão ou a amostra a testar. Seguiu-se uma incubação a 37°C durante 30 min no escuro. A absorvância foi medida a 535/590 nm numa placa de leitura ELISA. O cálculo da concentração de lactato foi feito através da fórmula $C = \text{La} / \text{Sv}$ em que La corresponde à quantidade de ácido láctico (nmol) da amostra e Sv corresponde ao volume da amostra adicionado a cada poço.

2.8. Western blot

Soluções

- RIPA buffer

25mM TRIS HCL

150mM NaCl

1% NP-40

1% sodium-deoxycholate

0.1% SDS (*Sodium dodecyl sulfate*)

- *Tris buffer saline (TBS)*

50mM Tris

150mM NaCl

pH 7.6

- *Laemmli sample buffer* (Bio-Rad)

62.5mM Tris-HCL

2% SDS (*Sodium dodecyl sulfate*)

25% glicerol

0.01% Brophenol Blue

5% 2-Mercaptoetanol

- *Tampão de corrida*

25mM Tris

192mM glicina

0.1%SDS

pH 8.2

- *Tampão de transferência*

25mM Tris

192mM glicina

20% ml metanol

pH 8.3

- *Solução de lavagem (TBST)*

1x TBS

0.1% Tween-20

- *Solução de bloqueio*

1 x TBS

0.1% Tween-20

5% Leite magro em pó

- Solução para o anticorpo primário e secundário

1XTBS

5% BSA

0.1% Tween-20

- Solução de RIPA por cada amostra

96µl de RIPA

1µl de inibidor de fosfatase

2µl de PMSF (*Phenylmethane sulfonyl fluoride*)

1µl de CLAP

Os níveis de expressão proteica foram determinados através da análise de Western blot, técnica que envolve a transferência de proteínas que foram separadas por gel de electrofose numa membrana, seguido da detecção imunológica.

As células foram mantidas nas condições mencionadas na secção 2.2 e dissociadas enzimaticamente com a accutase. As células foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 min, foi descartado o sobrenadante e adicionado PBS. De seguida procedeu-se a nova centrifugação a 1200 rpm durante 5 min e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuspensionado em 100µl da solução de RIPA suplementada com PMSF, CLAP e inibidor de fosfatases, e foi incubado por 5 min em gelo. Após a incubação, centrifugou-se a 500g por 15min. Os sobrenadantes contendo a proteína foram recolhidos e colocados a -80°C até serem utilizados.

As amostras contendo proteína foram quantificadas utilizando o método de BCA (ácido bicinonínico). Este método combina a redução de Cu^{2+} a Cu^{+} por proteínas em meio alcalino (reação do biureto) com a detecção colorimétrica, muito sensível e selectiva, do íão Cu^{+} usando um reagente contendo ácido bicinonínico (Pierce). Nesta reacção forma-se um produto de cor púrpura, solúvel em água, com forte absorvância a 570 nm, que é linear com concentrações crescentes de proteína, ao longo de uma gama extensa de concentrações de proteína (20 µg/ml – 2000 µg/ml).

Resumidamente, para a curva padrão utilizou-se uma solução stock (2 mg/ml) de albumina sérica bovina (BSA). A preparação do reagente de BCA foi feita na proporção de 50x de reagente A para 1x de reagente B. Numa placa de 96 poços, foi pipetado em cada poço,

25µl de amostra a quantificar, e foi adicionado o mesmo volume de água. Foi adicionado 200 µl do reagente de BCA e incubada a placa a 37°C durante 30 min. A absorvância foi medida a 570 nm numa placa de leitura ELISA e foi construído um gráfico da absorvância de cada uma das soluções padrão vs a sua concentração de proteína em µg/ml. Utilizando a curva padrão, a concentração de proteína para cada uma das amostras foi determinada. As amostras e a curva padrão foram quantificadas em duplicado.

As amostras de proteína foram preparadas para a corrida num gel, através da diluição em *Laemmli Sample buffer* e água de modo a ter o volume total de 30µl por amostra. As amostras foram assim desnaturadas a 98°C por 5min.

Posteriormente, as amostras foram corridas num gel de 12%, usando a solução de corrida descrita acima, a velocidade constante (60mA) durante hora e meia no gelo. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose usando a solução de transferência descrita acima a velocidade constante (100V) durante 2horas no gelo. As membranas foram bloqueadas com a solução de leite magro durante uma hora à temperatura ambiente e com agitação.

De seguida as membranas foram incubadas com o anticorpo primário (Tabela 2) diluído na solução descrita acima, durante a noite e a 4°C. Após a incubação as membranas foram lavadas três vezes com a solução de lavagem e incubadas novamente com o anticorpo secundário (Tabela 3) e foram feitas novas lavagens de 15 min.

As proteínas foram detectadas usando o kit contendo o reagente de quimioluminescência, ECL (GE Healthcare) onde volumes iguais do reagente de luminol e do reagente oxidante foram misturados. A mistura foi aplicada nas membranas por 5min a temperatura ambiente. O excesso de ECL foi removido das membranas utilizando papel de filtro e as membranas foram reveladas no aparelho VersaDoc. As bandas foram quantificadas com recurso ao programa QuantityOne e normalizadas com β-actina.

Tabela 2– Anticorpos primários utilizados na análise de *western blott* (WB) e Imunoperoxidase (IP).

Anticorpo	Origem	Diluição	Aplicação
Oct-4	Cell Signaling Technology	1:200	IP
Nanog	Santa Cruz	1:50	WB
GADPH	Cell Signaling Technology	1:200	IP
Hexokinase II	Cell Signaling Technology	1:1000	WB
PKM 1-2	Cell Signaling Technology	1:1000	WB
β – actina	Sigma- Aldrich	1:3000	WB

Tabela 3 – Anticorpos secundários utilizados na análise de *western blott* (WB) e Imunoperoxidase (IP).

Anticorpo	Origem	Diluição	Aplicação
Anti-mouse	Santa Cruz	1:1000	WB/ IP
Anti-rabbit	Abcam	1:1000	WB/IP

2.9. Imunoperoxidase

Soluções

- Solução de bloqueio

3% de BSA

0,25% Triton X-100

PBS

A imunoperoxidase é um tipo de coloração imunológica que é usada para reconhecer proteínas alvo com anticorpos específicos. A interação enzima-anticorpo reage com o seu substrato sendo possível visualizar o precipitado através da coloração produzida.

As células foram crescidas e drogadas diariamente durante 62h. Após este período, as células foram lavadas com PBS e a fixadas com uma solução de formaldeído a 4% durante 30 min à temperatura ambiente. A lavagem foi feita com PBS e repetida três vezes, seguidamente foi feita uma permeabilização com metanol durante 5 min a -20°C e nova lavagem e nova permeabilização com Triton 1% durante 15min. Depois, foi adicionado peróxido de hidrogénio 3% em PBS durante 5 min, procedeu-se à lavagem com PBS e adicionou-se a solução de

bloqueio durante pelo menos uma hora à temperatura ambiente. Após esta adição, incubou-se com os anticorpos primários Oct-4, Nanog e GADPH a 4°C durante a noite (**Erro! A origem da eferência não foi encontrada.**). Posteriormente foram feitas três lavagens com PBS e as células foram incubadas com o respectivo anticorpo secundário (Tabela 3) por uma hora a 37°C seguidas de nova lavagem.

A quantificação foi efectuada com o substrato TMB, sendo adicionado 250µl deste substrato a cada poço e incubado durante 20 min com recurso a agitação. Acabado o tempo de incubação retiraram-se 50µl de cada poço para uma placa de 96 poços, onde já tinham sido adicionados 150µl de ácido sulfúrico para parar a reacção. A leitura foi feita a 450nm num leitor de placas.

Após a leitura das placas de imunoperoxidase, efectuaram-se três lavagens e deixaram-se secar as mesmas à temperatura ambiente para se proceder ao ensaio de sulforodamina B.

O ensaio da sulforodamina B (SRB) baseia-se no conteúdo celular proteico e foi usado para normalizar as amostras. Quando as placas se encontravam completamente secas adicionou-se a solução de SRB (0,5% em 1% de ácido acético) por uma hora e à temperatura de 37°C. Depois foram feitas lavagens repetidas com ácido acético em água. Posteriormente, adicionou-se 1 ml de solução Tris (10mM pH=10) com agitação durante 15min. Retirou-se 200µl de cada poço para uma placa de 96 poços e a leitura foi feita a 540nm.

2.10. Detecção da actividade da fosfatase alcalina (FA)

Soluções:

- Solução *Fast Red Violet* (0.8g/L)
- Solução *Naphthol AS-BI phosphate* (4mg/ml) em *buffer AMPD* (2mol/L), pH=9.5

O estado indiferenciado de células estaminais embrionárias pode ser caracterizado através da expressão elevada de fosfatase alcalina. A fosfatase alcalina é uma hidrolase responsável pela desfosforilação de algumas moléculas como nucleótidos ou proteínas em condições alcalinas.

A actividade da fosfatase alcalina foi determinada usando o Kit (*Alkaline Phosphatase Detection Kit*, Milipore), quando as células estaminais estão no estado indiferenciado apresentam cor púrpura enquanto que as células diferenciadas não apresentam coloração. Resumidamente, as células foram crescidas e drogadas diariamente durante 62h. Ao fim destas retirou-se o meio e as células foram fixadas numa solução de formaldeído a 4% por 1

minuto, de seguida procedeu-se à lavagem com TBST e colocou-se o reagente de fosfatase alcalina, preparado previamente. A incubação foi feita em 20min à temperatura ambiente e no escuro. Findado este tempo a solução foi removida e foi adicionada a solução de lavagem. As células foram contadas ao microscópio na ampliação de 250x.

2.11. Análise estatística

A análise estatística foi feita utilizando o programa SPSS com a versão 20.0 de *software* para Windows (SPSS Inc, Chicago, IL). A normalidade dos dados foi testada pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e os resultados apresentam-se como média \pm Erro padrão do número de experiências realizado. A significância estatística entre as amostras controlo e as amostras teste foi feito com recurso ao teste ANOVA.

Resultados

Capítulo 3

3.1. Efeito do 3-Bromopiruvato na actividade metabólica e na viabilidade celular

As células estaminais embrionárias de murganho foram tratadas com diferentes concentrações de 3-Bromopiruvato (5, 10, 25 e 50 μ M) por 24, 48 e 62 horas. Os primeiros ensaios foram feitos para seleccionar a gama de concentrações e o tempo óptimo de exposição para os ensaios seguintes.

O efeito do fármaco na actividade metabólica foi determinado nas várias concentrações e durante 24, 48 e 62 horas (Figura 8).

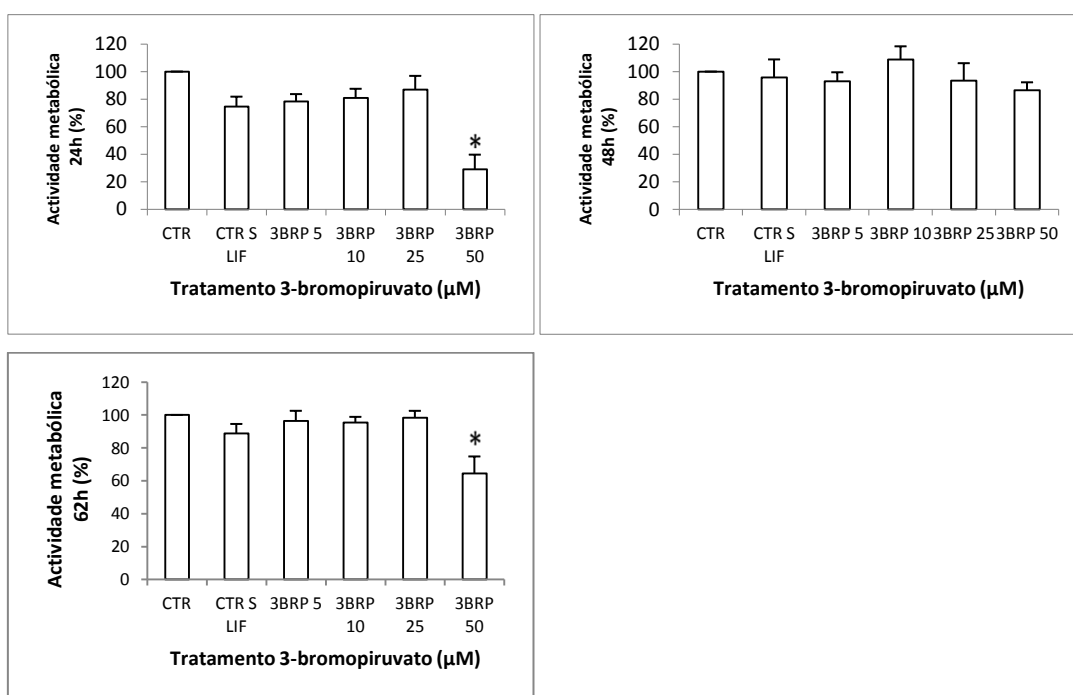


Figura 8 – Efeito do 3-bromopiruvato na actividade metabólica determinado por MTT em 24, 48 e 62 horas de incubação. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão de pelo menos três experiências independentes. * $p < 0,05$ comparado com o controlo (CTR).

A actividade metabólica diminui significativamente na concentração de 50 μ M, relativamente ao controlo, tanto às 24 horas como às 62 horas de incubação. Com base nos resultados anteriores foram escolhidas as duas concentrações mais elevadas (25 e 50 μ M).

Vários estudos demonstraram que 3-bromopiruvato levou à perda de viabilidade celular em células cangerígenas (Ko *et al.*, 2001; Xu *et al.* 2005; Pelicano, 2006; da Silva *et al.*, 2009). Por isso, o efeito do 3-bromopiruvato foi avaliado na viabilidade celular da linha E14 de mESCs nas concentrações de 25 e 50 μ M e durante 24, 48 e 62 horas de incubação. Tal como a

Figura 9 mostra, o 3-bromopiruvato não alterou a viabilidade celular nas diferentes das concentrações e ao longo do tempo de tratamento.

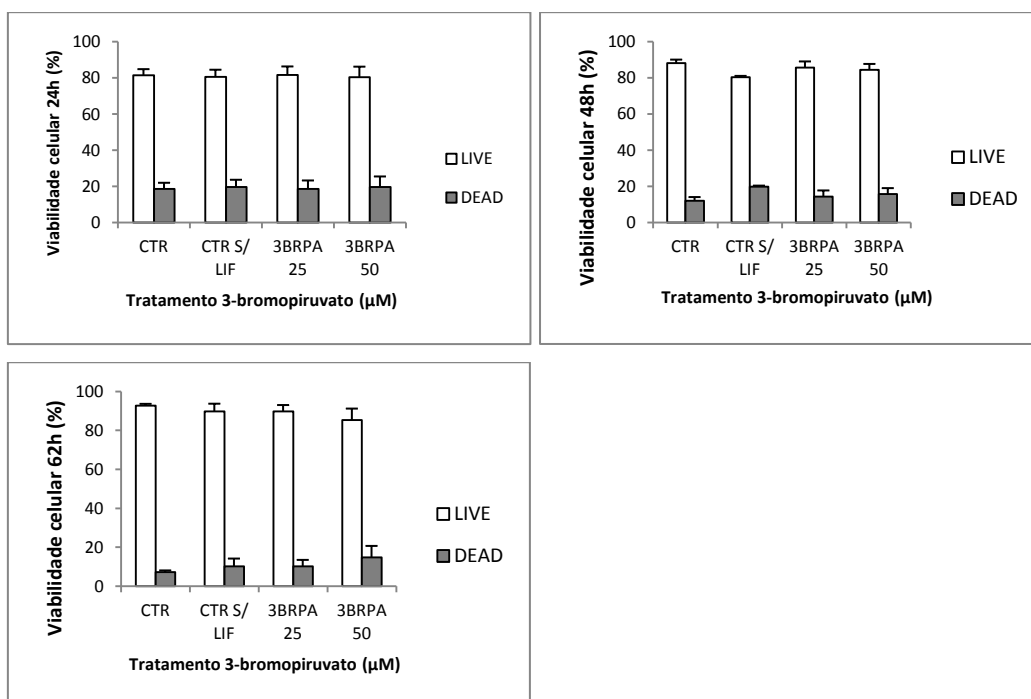


Figura 9 – Efeito do 3-bromopiruvato na viabilidade celular determinado por SYBR® 14 e IP em 24, 48 e- 62 horas de incubação. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão de pelo menos três experiências independentes.

3.2. Efeito do 3-Bromopiruvato na pluripotência

A expressão dos factores Nanog e Oct-4 foi avaliada durante o tratamento de modo a perceber o efeito do 3-bromopiruvato no potencial de diferenciação das células estaminais embrionárias de murgancho. O tempo de incubação escolhido foi de 62 horas e a linha celular E14 de mESCs foi então tratada com 25 e 50μM de 3-bromopiruvato.

Os níveis de Nanog foram detectados através da análise por western blot tal como a Figura 10-A mostra. Como pode ser observado na Figura 10-B o 3-bromopiruvato não afectou os níveis de expressão de Nanog relativamente ao controlo.

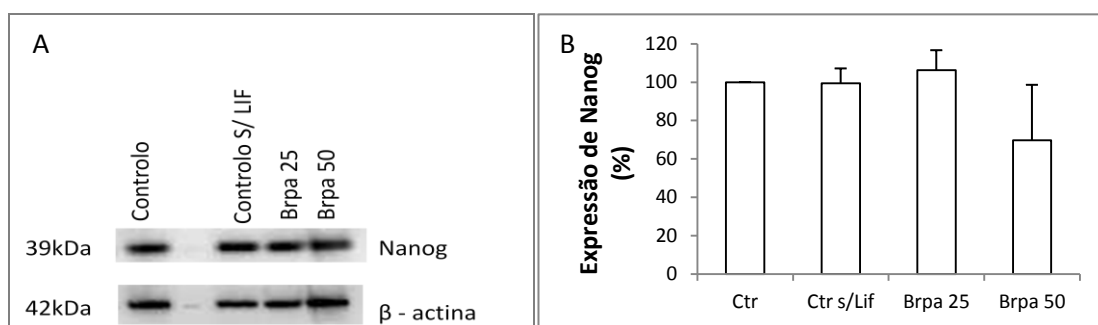


Figura 10 – Efeito do 3-bromopiruvato na pluripotência de mESCs – Nanog (62 horas de incubação). A) Western blot representativo dos níveis proteicos de Nanog. Blots semelhantes foram obtidos em três experiências independentes. B) Níveis de expressão de Nanog. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão.

O efeito de 3-bromopiruvato na expressão de Oct-4 foi determinado pelo método de imunoperoxidase. A Figura 11 mostra que existem diferenças estatisticamente significativas no controlo sem LIF e na concentração de 50 μ M de 3-bromopiruvato. Como era esperado, a remoção do LIF do meio de cultura resultou num decréscimo significativo da expressão de Oct-4 (Figura 11, $p < 0,05$, $n = 5$), confirmando a importância deste factor de crescimento na manutenção da pluripotência de mESCs.

Com a adição do fármaco verificou-se uma diminuição da expressão de Oct-4 o que sugere que o 3-bromopiruvato afecta a pluripotência das células estaminais embrionárias de murganho (Figura 11, $p < 0,05$, $n = 5$).

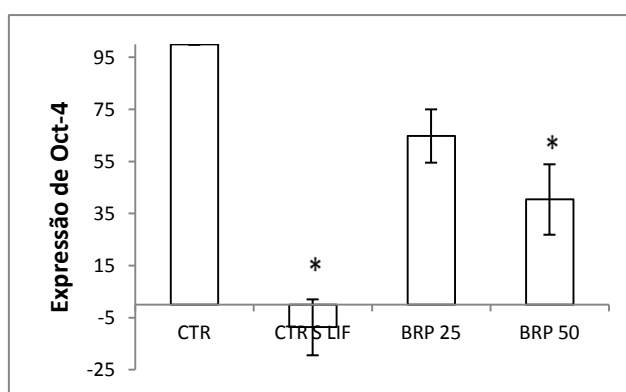


Figura 11 – Efeito do 3-bromopiruvato na pluripotência de mESCs – Oct-4 (62 horas de incubação). Níveis de expressão de Oct-4. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão de cinco experiências independentes. * $p < 0,05$ comparado com o controlo (CTR).

Para confirmar este resultado foi utilizado outro marcador de pluripotência, a fosfatase alcalina. O estado indiferenciado de células estaminais é caracterizado, para além da expressão de outros marcadores, por uma elevada expressão de fosfatase alcalina. As colónias foram divididas em três categorias de acordo com os padrões de expressão de fosfatase alcalina e foram posteriormente quantificadas: as colónias que apresentavam coloração na totalidade, têm elevada expressão de fosfatase alcalina, são designadas por marcadas; as colónias parcialmente positivas para a fosfatase alcalina são designadas por parcialmente marcadas; e as colónias que não apresentavam qualquer coloração são designadas por não marcadas. Para cada tratamento foram contadas pelo menos 200 colónias. Como esperado, o controlo sem LIF apresenta um decréscimo significativo nas colónias positivas para a fosfatase alcalina (Figura 12, $p < 0,05$, $n=4$). A adição do agente anti-tumoral na concentração de $50\mu\text{M}$ apresentou também uma diminuição do número de colónias positivas, o que sugere mais uma vez que o fármaco altera o estado indiferenciado das células estaminais.

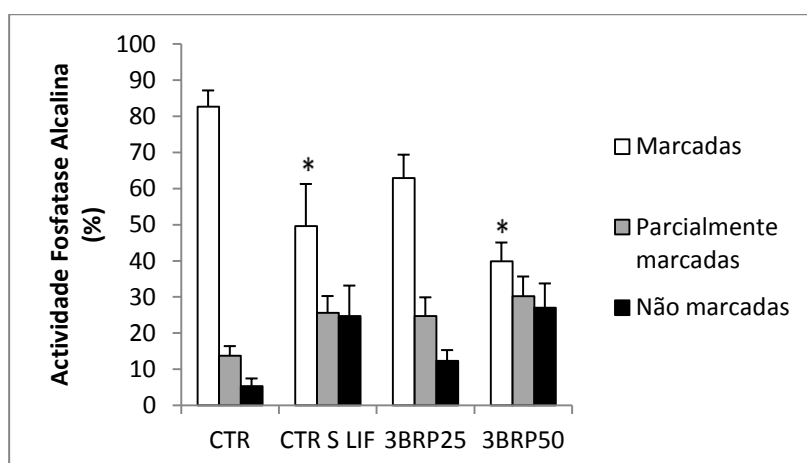


Figura 12 – Efeito do 3-bromopiruvato na pluripotência de mESCs – Actividade da fosfatase alcalina (62 horas de incubação). Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão de quatro experiências independentes. * $p < 0,05$ comparado com o controlo (CTR).

3.3. Efeitos do 3-bromopiruvato no metabolismo celular

Os efeitos do 3-bromopiruvato foram já estudados no metabolismo de várias linhas celulares cancerígenas, não havendo descrição na literatura do efeito do fármaco em células estaminais. Este efeito do fármaco na pluripotência de células estaminais embrionárias, conduziu ao estudo dos alvos preferenciais do 3-bromopiruvato. Assim durante o tratamento com 3-bromopiruvato, a actividade de enzimas glicolíticas, como a hexoquinase II, a GAPDH entre outras, a produção de lactato e a produção de ATP foram avaliadas, de modo a perceber se o efeito inibitório na pluripotência se devia a alterações metabólicas.

A Figura 13-A mostra um blot representativo dos níveis de proteína de hexoquinase II detectados através da análise por western blot. Na Figura 13-B é possível verificar que, ao contrário do que era esperado, o 3bromopiruvato não alterou os níveis de expressão da hexoquinase II.

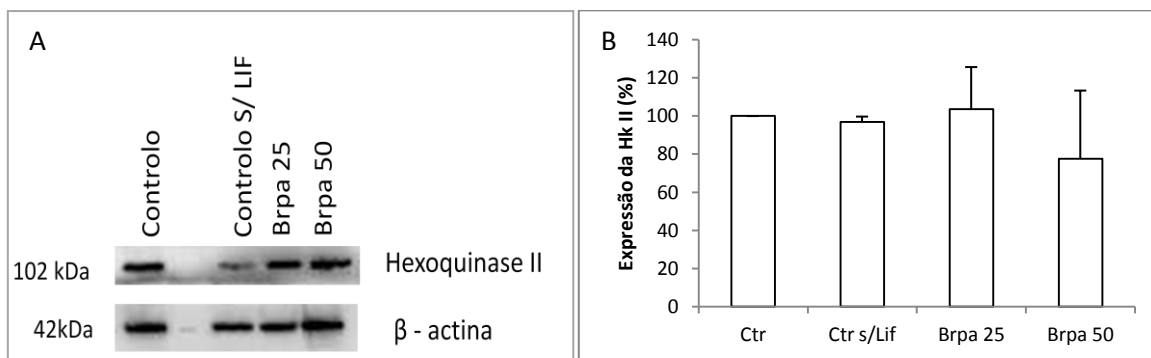


Figura 13 – Efeito do 3-bromopiruvato no metabolismo de mESCs – Hexoquinase II (HkII) (62 horas de incubação). A) Western blot representativo dos níveis de proteína de hexoquinase II. Blots semelhantes foram obtidos em duas experiências independentes. B) Níveis de expressão da hexoquinase II. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão.

A gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é outra das enzimas descritas como sendo um dos alvos do 3-bromopiruvato (Dell'Antone, 2009; Ganapathy-Kanniappan *et al.*, 2009; da Silva *et al.*, 2009). Na Figura 14 é possível verificar que, ao contrário do que era esperado, o 3bromopiruvato também não alterou os níveis de expressão de GAPDH.

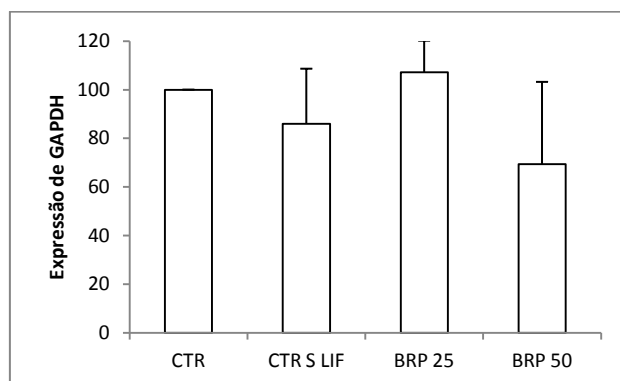


Figura 14 – Efeito do 3-bromopiruvato no metabolismo de mESCs – Níveis de expressão de GAPDH (62 horas de incubação). Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão de quatro experiências independentes.

Foi avaliada ainda a expressão das enzimas piruvato quinase (PKM 1-2) e piruvato desidrogenase (PDH). Tal como a Figura 15 mostra o 3bromopiruvato não alterou os níveis de expressão nem de PKM1-2 (Figura 15-A) nem de PDH (Figura 15-B).

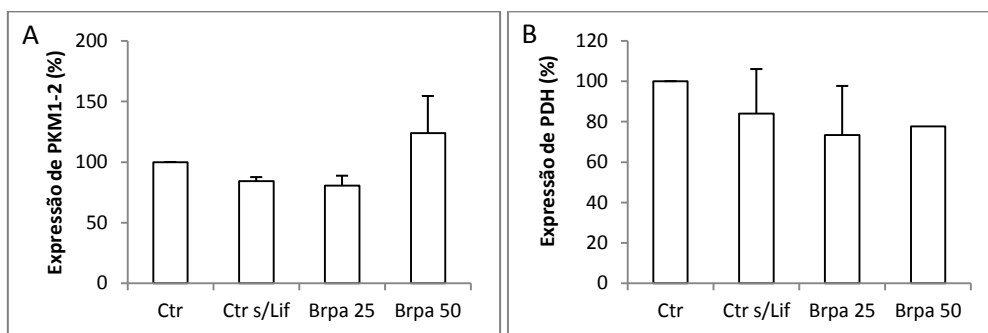


Figura 15 – Efeito do 3-bromopiruvato no metabolismo de mESCs – Níveis de expressão de PKM1-2 e PDH, respectivamente A e B (62 horas de incubação). Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão de três e duas experiências independentes, respectivamente. Abreviaturas: PKM1-2 – piruvato quinase isoforma muscular, PDH – piruvato desidrogenase.

O ensaio de quantificação de lactato extracelular foi medido tanto nos controlos como nas células tratadas com 3-bromopiruvato. Este ensaio mostrou que a produção deste não foi alterada com o tratamento do 3-bromopiruvato (Figura 16).

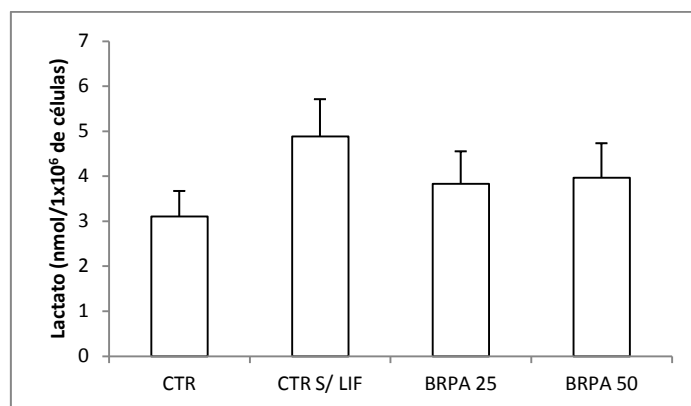


Figura 16 – Efeito do 3-bromopiruvato na produção de lactato (62 horas de incubação). Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão de cinco experiências independentes.

Após a investigação dos efeitos do 3-bromopiruvato na via glicolítica das células estaminais embrionárias E14 e devido aos efeitos reportados do composto na produção de ATP em células cancerígenas (Ko *et al.*, 2001; Xu *et al.* 2005; Pelicano, 2006), avaliou-se o efeito do agente anti-tumoral no conteúdo de nucleótidos de adenosina e na carga energética, como mostra a Figura 17.

Em oposição ao que seria expectável, o 3-bromopiruvato não causou depleção de ATP (Figura 17-A) relativamente ao controlo. A carga energética é calculada recorrendo a uma fórmula que integra tanto a produção de ATP, ADP como de AMP e como mostra a Figura 17-B, o 3-bromopiruvato não afectou a carga energética das células estaminais mas a remoção do LIF levou a um aumento significativo da mesma.

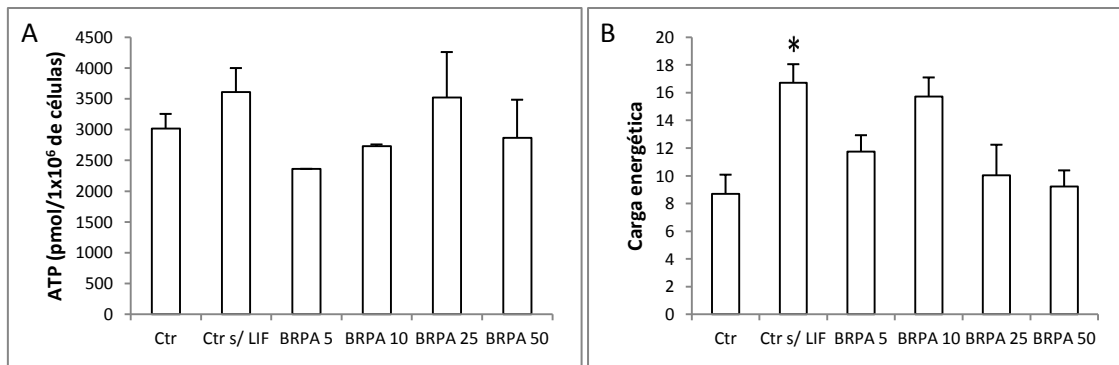


Figura 17 – Efeito do 3-bromopiruvato na produção de ATP e carga energética (62 horas de incubação). Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão de seis experiências independentes, com exceção para os tratamentos com BrPA 5 e 10 μ M que têm duas experiências. A fórmula da carga energética é: $0,5x (ADP + 2xATP) / (ATP + ADP + AMP)$. * $p < 0,05$ comparado com o controlo (CTR).

A par da descrição na literatura relativa à depleção de ATP, a perda da permeabilização da membrana externa também foi descrita em linhas celulares cancerígenas (Qin *et al.*, 2010).

O potencial membranal mitocondrial ($\Delta\psi_m$) é um importante indicador da função mitocondrial e pode ser determinado usando a sonda TMRM. Neste estudo o efeito do 3-bromopiruvato no potencial membranal mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em células estaminais embrionárias de murganho foi avaliado por citometria de fluxo. A Figura 18-A do lado esquerdo mostra os histogramas obtidos com as células marcadas com TMRM e do lado direito o respectivo tratamento com o desacoplador CCCP, não se verificando alterações significativas na deslocação do pico relativamente ao controlo. O que pode ser confirmado com a Figura 18-B que mede a intensidade de fluorescência dos picos. Isto sugere que o 3-bromopiruvato não afectou o potencial membranal mitocondrial.

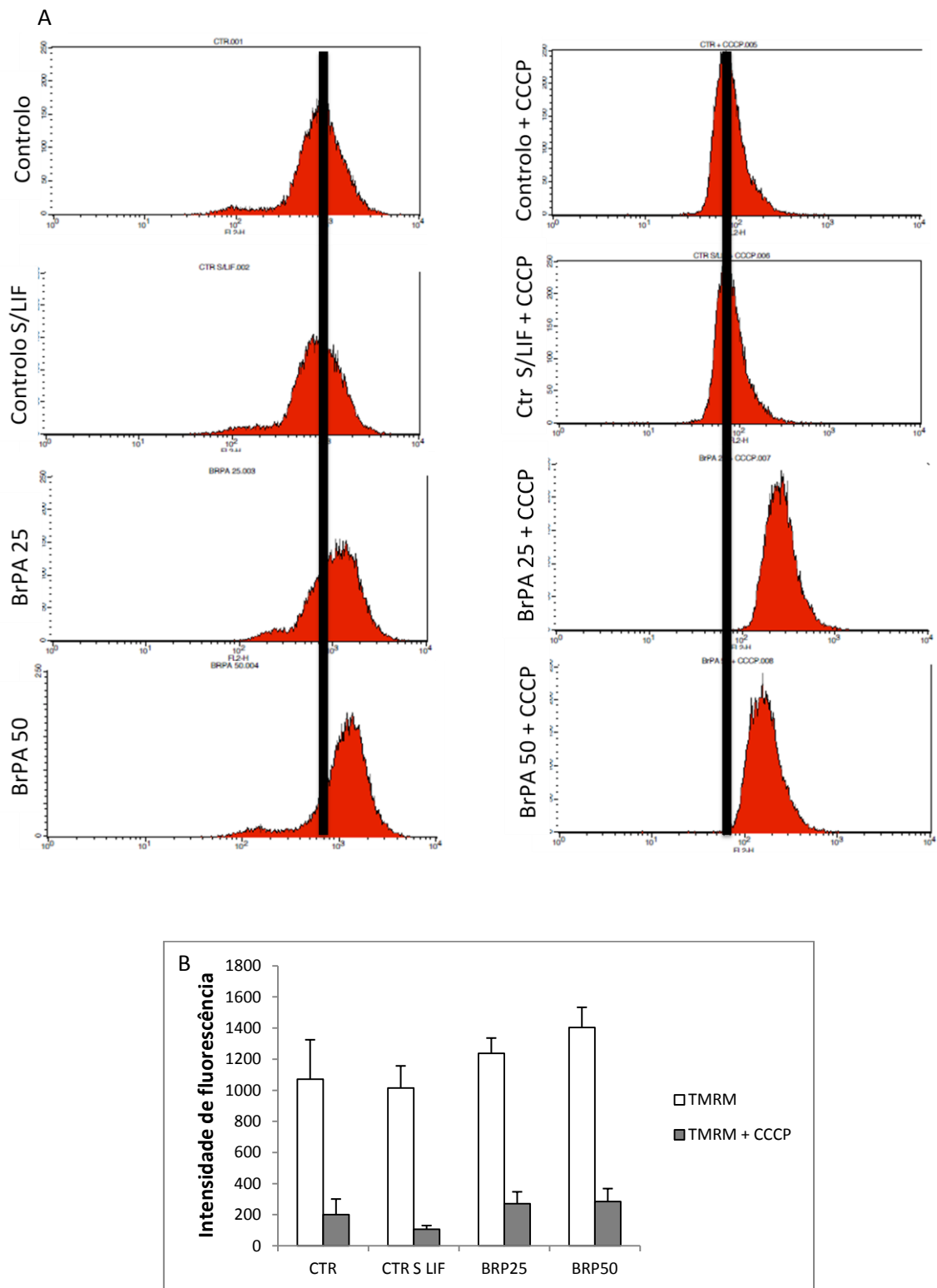


Figura 18 – Efeito do 3-bromopiruvato no potencial membranar mitocondrial ($\Delta\psi_m$) (62 horas de incubação). A) Histogramas de citometria de fluxo representativos das células estaminais embrionárias com a sonda TMRM e respectivos controles. B) Intensidade de fluorescência da sonda TMRM e respectivos controles com o tratamento de 3BrPA. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão de quatro experiências independentes.

Discussão

Capítulo 4

Considerando que as ESC derivam da ICM do blastocisto, é expectável que apresentem um perfil metabólico e morfológico semelhante. Nas células estaminais o metabolismo recai preferencialmente no uso da glicólise como fonte de energia devido não só à imaturidade das mitocôndrias como também ao pouco oxigénio disponível (hipóxia) e à limitada capacidade de produzir ATP. Estas propriedades mitocondriais parecem estar conservadas em células estaminais embrionárias sugerindo que possam ser importantes na manutenção da pluripotência (Facucho-Oliveira e St John, 2009). Este perfil metabólico, bem como as características relativas à proliferação ilimitada e a capacidade de diferenciação em tecidos específicos, são partilhadas, em parte, também por alguns tipos de células cancerígenas (Kopper *et al.*, 2004; Costello *et al.*, 2005).

O 3-bromopiruvato tem despertado interesse por ser um agente alquilante capaz de reagir com o grupo tiol e hidroxilo de várias enzimas. A crescente evidência da sua capacidade em inibir várias enzimas, nomeadamente enzimas glicolíticas, contribuiu para que fosse considerado um presumível agente anti-tumoral. Tem vindo a ser estudado em diferentes células cancerígenas, não existindo até ao momento estudos em células estaminais.

4.1. O 3-bromopiruvato afecta a pluripotência

O estado indiferenciado das células estaminais embrionárias é caracterizado pela presença de marcadores celulares específicos, nomeadamente Oct-4, Sox2 e Nanog, que estão envolvidos quer na manutenção da auto-renovação quer na pluripotência. A pluripotência caracteriza-se pela capacidade das células darem origem a todos os tipos celulares de um organismo. No entanto, o mecanismo que regula a pluripotência não é totalmente conhecido.

No presente estudo, foi observada a expressão de Nanog e Oct-4 na linha celular E14 de células estaminais embrionárias de murganho. O tratamento com o 3-bromopiruvato mostrou que este levou à diminuição da expressão de Oct-4 mas não afectou a expressão de Nanog. Tal como Nanog, Oct-4 ou Sox2, a fosfatase alcalina está relacionada com a pluripotência das células estaminais. A Figura 12 mostra que o 3-bromopiruvato diminuiu significativamente as colónias positivas para este marcador.

Até ao momento não havia sido descrito o efeito do 3-bromopiruvato na pluripotência de células estaminais embrionárias e os resultados obtidos sugerem que este composto levou a alguma perda de pluripotência.

4.2. O 3-bromopiruvato não afecta a viabilidade celular

Os agentes anti-tumorais afectam frequentemente a homeostasia da célula podendo levar à morte celular. O efeito do 3-bromopiruvato foi verificado neste contexto.

A apoptose está bem definida através de alterações morfológicas celulares como a condensação das membranas plasmática e nuclear, bem como condensação da cromatina, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos. Bioquimicamente a apoptose, requer energia, e é caracterizada por alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial, na activação da cascata de caspases e fragmentação de DNA não aleatória. Em oposição, a necrose é caracterizada por um inchaço da célula e dos organelos citoplasmáticos e uma rápida perda da integridade da membrana plasmática.

Está bem documentado que a morte celular de células cancerígenas induzida através do tratamento com 3-bromopiruvato depende da depleção do ATP celular (Ko *et al.*, 2001; Pelicano, 2006). Associado a esta depleção através da inibição da enzima hexoquinase, foi demonstrado que o 3-bromopiruvato induziu a apoptose em linhas celulares de leucemia e linfoma pela desfosforilação da proteína pro-apoptótica BAD na Ser-112, que levou à re-localização de Bax e à libertação do citocromo c (Xu *et al.*, 2005). No entanto, Qin e colaboradores demonstraram que o 3-bromopiruvato induz necrose em melanoma (Qin *et al.*, 2010). Quando células de hepatoma foram expostas ao composto 3-bromopiruvato, Kim e colaboradores consideraram que a rápida depleção de ATP levou à necrose das células, sendo uma das características da necrose, mas também verificaram morte celular por apoptose (Kim *et al.*, 2008).

Neste estudo, o 3-bromopiruvato não provocou um aumento da morte celular relativamente ao controlo, não afectando por isso a viabilidade celular. No entanto, as concentrações de 3-bromopiruvato utilizadas neste estudo foram muito inferiores às usadas em estudos com células cancerígenas, podendo ser esse um factor determinante no resultado obtido.

Relativamente à actividade metabólica, avaliada através da redução de MTT, verificou-se um decréscimo significativo com o tratamento do agente anti-tumoral (Figura 8). Este ensaio foi avaliado noutros estudos mas com células cancerígenas. Macchioni e colaboradores verificaram que com a concentração de 70 μ M de 3-bromopiruvato, em células glioblastoma, a redução de MTT diminuía cerca de 30% (Macchioni *et al.*, 2011). Com uma linha celular de leucemia, Xu e colaboradores verificaram que a concentração de 50 μ M reduziu em cerca de 40% a actividade das células (Xu *et al.*, 2005). Esta redução de 40% também foi obtida numa

linha celular do cancro do cólon mas com a concentração de 100 μ M (Ihrlund *et al.*, 2008). Em hepatocarcinoma com 50 μ M de 3-bromopiruvato, Pereira da Silva e colaboradores verificaram uma redução de 50% (Pereira da Silva *et al.*, 2009) enquanto que em cancro da mama a concentração que causou efeito foi de 25 μ M (Liu *et al.*, 2009).

4.3. O 3-bromopiruvato não afecta o metabolismo celular nos parâmetros estudados

As células estaminais indiferenciadas dispõem de um metabolismo alterado quando comparado com as células diferenciadas, resultando numa capacidade aumentada da via glicolítica e consequentemente formação e acumulação de lactato que leva a uma acidificação do meio extracelular (Chung *et al.*, 2007; Kondoh *et al.*, 2007). Em linha com este facto, a preservação da mitocôndria imatura, os baixos níveis de fosforilação oxidativa e os baixos níveis de consumo de oxigénio em células estaminais indiferenciadas podem servir como indicadores da competência da célula estaminal (Lonergan *et al.*, 2006).

Como se verificou um decréscimo significativo na actividade metabólica das mESCs com o tratamento de 3-bromopiruvato, alguns parâmetros do metabolismo celular foram avaliados.

No presente estudo, a expressão de alguns alvos metabólicos do 3-bromopiruvato foi analisada por western blot e imunoperoxidase, na linha celular E14 de células estaminais embrionárias de murganho. Devido ao uso preferencial da glicólise em células estaminais e células cancerígenas, é possível especular que a expressão das enzimas glicolíticas possam estar sobre-expressas nestas células.

A inibição *in vitro* da actividade da hexoquinase II foi demonstrada em hepatocarcinoma com uma concentração de 5mM de 3-bromopiruvato, enquanto a glicólise foi totalmente inibida a 15mM (Ko *et al.*, 2001). Outros estudos relataram a inibição de GAPDH por 3-BrPA. As fracções citosólicas de fígado de rato foram tratadas com 3-BrPA e de entre as várias enzimas glicolíticas estudadas, incluindo a HKII, a GAPDH foi a mais inibida com 150 μ M durante 30min (da Silva *et al.*, 2009). Verificou-se também que o agente anti-tumoral actuava directamente na enzima GAPDH através da piruvilação e que esta modificação afectava negativamente a GAPDH na sua função e ajudava na morte celular (Ganapathy-Kanniappan *et al.*, 2009). Contudo, na linha celular E14 do presente estudo, o 3-bromopiruvato não pareceu alterar a expressão destas enzimas.

Outras enzimas glicolíticas foram avaliadas como PKM1-2 e PDH. Não há estudos que demonstrem o efeito do 3-bromopiruvato na piruvato quinase (PKM1-2). Embora alguns estudos mostrem que o 3-bromopiruvato inibe a PDH. Usando uma linha knockout para PDC de murganho, Korotchkina e colaboradores inibiram a piruvato desidrogenase (PDH) com 6 μ M de 3-bromopiruvato (Korotchkina *et al.*, 1999). Noutro estudo, Kumar e colaboradores mostraram que este composto inibiu a piruvato desidrogenase de espermatozóides de hamster (Kumar *et al.*, 2008). Neste estudo a expressão destas enzimas também não foi afectada.

Como resultado do aumento da utilização da respiração anaeróbia por parte das células estaminais, há um aumento da produção de lactato. Neste estudo, a acumulação de lactato no meio extracelular foi quantificada para verificar o efeito do 3-bromopiruvato na inibição da via glicolítica. Tal como a Figura 16 mostra não se verificou qualquer alteração. Este resultado está de acordo com os resultados obtidos para as enzimas glicolíticas uma vez que também aí não se verificaram efeitos. Porém, o resultado esperado com a inibição da glicólise pelo 3-bromopiruvato era o de uma redução na produção de lactato. Num estudo feito em hepatocarcinoma foi reportado que a concentração de 150 μ M de 3-bromopiruvato diminuiu significativamente esta produção (Pereira da Silva *et al.*, 2009). Noutro estudo, a incubação de células de linfoma e de células do cancro do cólon com o agente anti-tumoral em condições de hipóxia causou uma inibição na glicólise e um decréscimo na produção de lactato significativos (Xu *et al.*, 2005).

A formação de ATP por fosforilação oxidativa na mitocôndria depende da integridade da cadeia respiratória e também do potencial membranar mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Por outro lado, foi já previamente descrito na literatura que o 3-bromopiruvato induz depleção de ATP mas também afecta outros alvos mitocondriais.

Em linhas celulares de melanoma foi demonstrado que o 3-BrPA induziu a geração de espécies reactivas de oxigénio (ROS), baixou os níveis de glutatona, levou à perda da permeabilização da membrana externa e levou à depleção de ATP, consequentemente levou à morte celular por necrose (Qin *et al.*, 2010). Em células de hepatoma tratadas com 3-bromopiruvato, Kim e colaboradores mostraram que este levou à desregulação mitocondrial através da depleção de ATP, aumento da produção de ROS e perda do potencial de membrana mitocondrial e consequentemente à morte das células (Kim *et al.*, 2008). Mais recentemente e em concordância com estes resultados também em hepatoma, o 3-BrPA inibiu o potencial membranar, o consumo de oxigénio, a actividade da enzima succinato desidrogenase e a ligação da hexoquinase à mitocôndria (Rodrigues-Ferreira *et al.*, 2012).

Neste trabalho, a avaliação do conteúdo de nucleótidos de adenosinas foi feito por HPLC e a carga energética foi calculada. Os resultados mostraram que o tratamento com o 3-bromopiruvato não levou à depleção de ATP. Relativamente à carga energética também não se verificaram alterações no tratamento em relação ao controlo, mas o controlo sem LIF mostrou um aumento significativo muito provavelmente devido a um “shift” metabólico que as células possam estar a passar.

Foi ainda avaliado o potencial membranar mitocondrial por citometria de fluxo e os resultados mostraram que o tratamento com agente anti-tumoral não afectou o potencial membranar mitocondrial (Figura 18).

Os resultados obtidos não permitem estabelecer através de que mecanismo é que o 3-bromopiruvato afecta a pluripotência das ESC. Mais experiências serão necessárias para caracterizar o efeito deste composto nas mESCs, como por exemplo a detecção de produção de ROS. Como demonstrado em vários estudos, a produção de ROS pode ser uma das consequências do tratamento com o 3-bromopiruvato que é aumentada (Qin *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2008). A avaliação da produção de ROS não foi analisada neste estudo pelo que seria importante verificar se o 3-bromopiruvato tem o mesmo efeito nas células estaminais do relatado em células cancerígenas. Outra avaliação importante seria a medição do consumo de oxigénio.

O metabolismo celular envolve uma infinidade de mecanismos direccionados para garantir o fornecimento constante de energia e metabolitos para o organismo. Quanto mais complexo é o organismo, mais complexa é também o seu metabolismo, como no caso de mamíferos. Assim, apesar de conhecermos diversos mecanismos metabólicos, ainda estamos muito distantes da compreensão total do metabolismo celular.

Conclusões e perspectivas futuras

Capítulo 5

Conclusão

Um número considerável de estudos tem vindo a relacionar o perfil metabólico das células estaminais com o seu estado indiferenciado.

No presente estudo foi demonstrado que o 3-bromopiruvato tem um efeito negativo na pluripotência das células estaminais embrionárias de murganho sem afectar a sua viabilidade. No entanto essa alteração não depende dos parâmetros metabólicos medidos.

Perspectivas futuras

Muitas questões permanecem por responder e para tal seria necessário proceder a mais experiências para complementar este trabalho.

Para caracterizar melhor o metabolismo será necessário ainda verificar a produção de espécies reactivas de oxigénio e verificar a actividade da succinato desidrogenase visto que é outro dos alvos deste composto bem como estudar a actividade da hexoquinase e da GAPDH pois neste estudo apenas se estudou a sua expressão. Seria também importante avaliar o parâmetro do consumo de oxigénio por parte destas células.

É importante saber a localização do factor de transcrição Oct-4, pois pode haver uma translocação do núcleo para o citoplasma.

Seria também interessante verificar a localização da hexoquinase II, esta enzima é encontrada normalmente no citoplasma mas pode estar ligada à mitocôndria através de VDAC e deste modo alterar a sua função na célula.

Referências bibliográficas

Capítulo 6

- Avilion, A A, Nicolis, S K, Pevny, L H, Perez L, Vivian, N & Lovell-badge, R (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & Development*, 126-140. doi:10.1101/gad.224503.derm
- Azoulay-Zohar, H, Israelson, A, Abu-Hamad, S and Shoshan-Barmatz, V (2004). In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Biochem. J.* 377: 347–355.
- Bajada, S, Mazakova, I, Richardson, JB, Ashammakhi, N, Jones, R, Hunt, A, & Hospital, O (2008). Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *Stem Cells*, 169-183. doi:10.1002/term
- Berridge, MV, Herst PM, Tan AS (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechn. Annu. Rev.* 11, 127-152.
- Bustamente, P, Krummeck, G, Rodel, G (1977). Hexokinase: the direct link between mitochondrial and glycolytic reaction in rapidly growing cancer cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 92, 363-380.
- Cairns, R a, Harris, IS, & Mak, TW (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nature reviews. Cancer*, 11(2), 85-95. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nrc2981.
- Cardaci S, Desideri E & Ciriolo M R (2012). Targeting aerobic glycolysis: 3-bromopyruvate as a promising anticancer drug. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 17-29. doi:10.1007/s10863-012-9422-7
- Chambers, I, Silva, J, Colby, D, Nichols, J, Nijmeijer, B, Robertson, M, Vrana, J, Jones, K, Grotewold, L, Smith, A (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* 442 (7102): 533-38.
- Chan, D. C. (2006). Mitochondrial Fusion and Fission in Mammals. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104638
- Chen, Z, Zhang, H, Lu, W & Huang, P (2009). Role of mitochondria-associated hexokinase II in cancer cell death induced by 3-bromopyruvate. *Biochimica et biophysica acta*, 1787(5), 553-60. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.bbabbio.2009.03.003

- Chen, C-T, Shih, Y-R V, Kuo, TK, Lee, OK, & Wei, Y-H (2008). Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 26(4), 960-8. doi:10.1634/stemcells.2007-0509.
- Cho YM, Kwon S, Pak YK *et al.* (2006). Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 348:1472–1478.
- Chung S, Dzeja PP, Faustino RS *et al.* (2007). Mitochondrial oxidative metabolism is required for the cardiac differentiation of stem cells. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 4(suppl 1):S60–S67.
- Colell A, Green DR, Ricci JR (2009). Novel roles for GAPDH in cell death and carcinogenesis. *Cell Death Differ* 16 (12): 1573-1581.
- Costello, L. C., & Franklin, R. B. (2005). “ Why do tumour cells glycolyse ?”: From glycolysis through citrate to lipogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1-8.
- Dang, CV & Semenza, GL (1999). Oncogenic alterations of metabolism. *Trends in biochemical sciences*, 24(2), 68-72.
- Dell’Antone, P (2006). Inactivation of H⁺-vacuolar ATPase by the energy blocker 3-bromopyruvate, a new antitumour agent. *Life Sci.* 79:2049-2055.
- Dell’Antone, P (2009). Targets of 3-Bromopyruvate, A New, Energy Depleting, Anticancer Agent Preparation of a Cytosolic Fraction from Rat Liver. *Energy*, (1), 491-496.
- Desojez, M & Zwaka, TP (2012). Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Annu. Rev. Biochem*, 81:17.1-17.29.
- Diaz-Ruiz, R, Rigoulet, M & Devin, A (2011). The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochimica et biophysica acta*, 1807(6), 568-76. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.bbabbio.2010.08.010
- Dimmer, K. S., & Scorrano, L. (2006). (De)constructing mitochondria: what for? *Physiology (Bethesda, Md.)*, 21, 233-41. doi:10.1152/physiol.00010.2006

- El Sayed SM, El-Magd RMA, Shishido Y, Chung SP, Diem TH, Sakai T, Watanabe H, *et al.* (2012). 3-Bromopyruvate antagonizes effects of lactate and pyruvate, synergizes with citrate and exerts novel anti-glioma effects. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 61-79. doi:10.1007/s10863-012-9409-4
- Ernst, M, Novak, U, Nicholson, S E, Layton, JE & Dunn, AR (1999). The Carboxyl-terminal Domains of gp130-related Cytokine. *Biochemistry*, 274(14), 9729-9737.
- Evans MJ, Kaufman, MH (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292:154-156.
- Ezashi T, Das P, Roberts RM (2005). Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 4783–4788.
- Facucho-Oliveira JM, Alderson J, Spikings EC *et al.* (2007) Mitochondrial DNA replication during differentiation of murine embryonic stem cells. *J Cell Sci*;120:4025–4034.
- Facucho-Oliveira, JM & St John, JC (2009). The relationship between pluripotency and mitochondrial DNA proliferation during early embryo development and embryonic stem cell differentiation. *Stem cell reviews*, 5(2), 140-58. doi:10.1007/s12015-009-9058-0
- Ganapathy-Kanniappan S, Geschwind JFH, Kunjithapatham R, Buijs M, Syed LH, Rao PP, Ota S, *et al.* (2010). 3-Bromopyruvate induces endoplasmic reticulum stress, overcomes autophagy and causes apoptosis in human HCC cell lines. *Anticancer research*, 30(3), 923-35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20393016>
- Ganapathy-Kanniappan S, Geschwind, J F H, Kunjithapatham R, Buijs M, Vossen J, Tchernyshyov I, Cole R N, *et al.* (2009). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is pyruvylated during 3-bromopyruvate mediated cancer cell death. *Anticancer research*, 29(12), 4909-18.
- Geschwind JF, Ko YH, Toberson MS, Magee C, Pedersen PL (2002). Novel therapy for liver cancer: direct intraarterial injection of a potent inhibitor of ATP production. *Cancer Res.* 62 (14): 3909-3913.
- Gilbert, Scott F (2010). *Developmental Biology*, Ninth Edition, Sinauer Associates.

- Gogvadze, V, Orrenius, S & Zhivotovsky, B (2008). Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? *Trends in cell biology*, 18(4), 165-73. doi:10.1016/j.tcb.2008.01.006.
- Gogvadze, V, Zhivotovsky, B & Orrenius, S (2010). The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells. *Molecular aspects of medicine*, 31(1), 60-74. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.mam.2009.12.004
- Gregersen N, Hansen J, Pamfeldt J (2012). Mitochondrial proteomics – a tool for the study of metabolic disorders. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, Volume 35, Number 4, 715-726, DOI: 10.1007/s10545-012-9480-3
- Hara, MR, Agrawal, N, Kim, SF, Cascio, MB, Fujimuro, M, Ozeki, Y *et al* (2005). S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat Cell Biol* 7 (7):665–674.
- Ihrlund, LS, Hernlund, E, Khan, O & Shoshan, MC (2008). 3-Bromopyruvate as inhibitor of tumour cell energy metabolism and chemopotentiator of platinum drugs. *Molecular oncology*, 2(1), 94-101. doi:10.1016/j.molonc.2008.01.003
- Jae, HJ, Chung, JW, Park, H S, Lee, MJ, Lee, KC, Kim, H-C, Yoon, JH, *et al.* (2009). The antitumor effect and hepatotoxicity of a hexokinase II inhibitor 3-bromopyruvate: in vivo investigation of intraarterial administration in a rabbit VX2 hepatoma model. *Korean journal of radiology : official journal of the Korean Radiological Society*, 10(6), 596-603. doi:10.3348/kjr.2009.10.6.596
- Keith, B & Simon, MC (2007). Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell*, 129(3), 465-72. doi:10.1016/j.cell.2007.04.019.
- Kim, JS, Ahn, KJ, Kim, J-A, Kim, HM, Lee, JD, Lee, JM, Kim, SJ, *et al.* (2008). Role of reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysregulation in 3-bromopyruvate induced cell death in hepatoma cells : ROS-mediated cell death by 3-BrPA. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 40(6), 607-18. doi:10.1007/s10863-008-9188-0
- Kim, J.-whan, Gao, P, Liu, Y-C, Semenza, GL & Dang, CV (2007). Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Molecular and cellular biology*, 27(21), 7381-93. doi:10.1128/MCB.00440-07.

- Kim, J.-whan, Gardner, LB, & Dang, CV (2005). Oncogenic alterations of metabolism and the Warburg effect. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 2(2), 233-238. doi:10.1016/j.ddmec.2005.04.001.
- Ko, Y H, Pedersen, P L, & Geschwind, J F (2001). Glucose catabolism in the rabbit VX2 tumor model for liver cancer: characterization and targeting hexokinase. *Cancer letters*, 173(1), 83-91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11578813>
- Ko, Y H, Verhoeven, H a, Lee, M J, Corbin, D J, Vogl, T J, & Pedersen, P L (2012). A translational study “case report” on the small molecule “energy blocker” 3-bromopyruvate (3BP) as a potent anticancer agent: from bench side to bedside. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 163-170. doi:10.1007/s10863-012-9417-4
- Ko, Young H, Smith, B. L., Wang, Y., Pomper, M. G., Rini, D. a, Torbenson, M. S., Hullihen, J., et al. (2004). Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP. *Biochemical and biophysical research communications*, 324(1), 269-75. doi:10.1016/j.bbrc.2004.09.047
- Kondoh, H, Leonart, ME, Nakashima, Y et al. (2007). A high glycolytic flux supports the proliferative potential of murine embryonic stem cells. *Antioxid Redox Signal* 9:293–299.
- Kopper, L., & Hajdú, M. (2004). Tumor Stem Cells. *Pathology Oncology Research*, 10(2), 69-73.
- Korotchikina, LG, Showkat, AM, Patel, MS (1999). Involvement of alpha-cysteine-62 and beta-tryptophan-135 in human pyruvate dehydrogenase catalysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 369: 277-287.
- Kumar, V, Kota, V, Shivaji, S (2008). Hamster sperm capacitation: role of pyruvate dehydrogenase A and dihydrolipoamide dehydrogenase. *Biol. Reprod.* 79: 190-199.
- Lehninger, AL, Nelson, DL, Cox MM (2005) Principles of biochemistry, 4th edition, New York , W.H. Freeman.
- Liu XH, Zheng XF, Wang YL (2009). Inhibitive effect of 3-bromopyruvic acid on human breast cancer MCF-7 cells involves cell cycle arrest and apoptotic induction. *Chinese Medical Journal*, 122 (14), 1681-1685.

- Lonergan, T, Brenner, C, Bavister, B (2006). Differentiation-related changes in mitochondrial properties as indicators of stem cell competence. *Journal of Cellular Physiology*, 208, 149-153.
- Macchioni, L, Davidescu, M, Sciaccaluga, M, Marchetti, C, Migliorati, G, Coaccioli, S, Roberti, R, *et al.* (2011). Mitochondrial dysfunction and effect of antiglycolytic bromopyruvic acid in GL15 glioblastoma cells. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 43(5), 507-18. doi:10.1007/s10863-011-9375-2
- Majewski, N, Nogueira, V, Bhaskar, P, Coy, PE, Skeen, J E, Gottlob, K, Chandel, N S, *et al.* (2004). Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Molecular cell*, 16(5), 819-30. doi:10.1016/j.molcel.2004.11.014.
- Mandal, S, Lindgren, AG, Srivastava, AS, Clark, AT, & Banerjee, U (2011). Mitochondrial function controls proliferation and early differentiation potential of embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 29(3), 486-95. doi:10.1002/stem.590.
- Martin GR, (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78: 7634-7638.
- Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K Okochi H, Okuda A, Matoba R, Sharov AA, Ko MS, Niwa H (2007). Pluripotency governed by SOX2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* 9(6):625-35.
- Mathupala, SP, Ko, YH, & Pedersen, PL (2006). Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene*, 25(34), 4777-86. doi:10.1038/sj.onc.1209603.
- Mathupala, SP, Ko, YH, & Pedersen, PL (2009). Hexokinase-2 bound to mitochondria: cancer's stygian link to the "Warburg Effect" and a pivotal target for effective therapy. *Seminars in cancer biology*, 19(1), 17-24. doi:10.1016/j.semcancer.2008.11.006.
- McBride, HM, Neuspiel, M, & Wasiak, S (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. *Current biology : CB*, 16(14), R551-60. doi:10.1016/j.cub.2006.06.054.

- Metzler D.E. (2003). Biochemistry: the chemical reactions of living cells, second edition, vol.1 e 2, Elsevier Academic Press
- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh, H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, *et al.* (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 113(5), 631-42
- National Institutes of Health (2004). Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions, University Press of the Pacific.
- Niwa H, Miyazaki J, Smith AG (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* 24, 372-376.
- Niwa H, Ogawa K, Shimosato D, Adachi K (2009). A parallel circuit of LIF signaling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* 460(7251):118-22.
- Niwa, H, Burdon, T, Chambers, I, & Smith, A (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes & development*, 12(13), 2048-60.
- Paling, NRD, Wheadon, H, Bone, HK, & Welham, MJ (2004). Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. *The Journal of biological chemistry*, 279(46), 48063-70. doi:10.1074/jbc.M406467200.
- Pan, G & Thomson JA (2007). "Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency." *Cell Res* 17(1): 42-49.
- Pastorino, JG and Hoek, JB (2009). Regulation of hexokinase binding to VDAC. *Journal Of Bioenergetics*, 40(3), 171-182. doi:10.1007/s10863-008-9148-8.
- Pastorino, JG., Shulga, N, & Hoek, JB (2002). Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 277(9), 7610-8. doi:10.1074/jbc.M109950200.
- Pereira da Silva, AP, El-Bacha, T, Kyaw, N, dos Santos, RS, da-Silva, WS, Almeida, FCL, Da Poian, AT, *et al.* (2009). Inhibition of energy-producing pathways of HepG2 cells by 3-bromopyruvate. *The Biochemical journal*, 417(3), 717-26. doi:10.1042/BJ20080805

- Piccoli, C, Ria, R, Scrima, R, Cela, O, D'Aprile, A, Boffoli, D, Falzetti, F, *et al.* (2005). Characterization of mitochondrial and extra-mitochondrial oxygen consuming reactions in human hematopoietic stem cells. Novel evidence of the occurrence of NAD(P)H oxidase activity. *The Journal of biological chemistry*, 280(28), 26467-76. doi:10.1074/jbc.M500047200.
- Qin, J-Z, Xin, H, & Nickoloff, BJ (2010). 3-Bromopyruvate induces necrotic cell death in sensitive melanoma cell lines. *Biochemical and biophysical research communications*, 396(2), 495-500. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.bbrc.2010.04.126.
- Ramalho-Santos, J., Varum, S., Amaral, S., Mota, P. C., Sousa, A. P., & Amaral, A. (2009). Mitochondrial functionality in reproduction : from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Human Reproduction*, 15(5), 553-572.
- Rodrigues-Ferreira, C, da Silva, APP & Galina, A (2012). Effect of the antitumoral alkylating agent 3-bromopyruvate on mitochondrial respiration: role of mitochondrially bound hexokinase. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 39-49. doi:10.1007/s10863-012-9413-8.
- Schmidt, EV (1999). The role of c-myc in cellular growth control. *Oncogene*, 18(19), 2988-96. doi:10.1038/sj.onc.1202751
- Shimizu, S, Konishi, A, Kodama, T and Tsujimoto, Y (2000). BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 3100–3105.
- St John, JC, Ramalho-Santos, J, Gray, HL, Petrosko, P, Rawe, VY, Navara, CS, Simerly, CR, Schatten, GP (2005). The expression of mitochondrial DNA transcription factors during early cardiomyocyte *in vitro* differentiation from human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells*;7:141–153.
- St John, JC, Facucho-Oliveira, J, Jiang, Y, Kelly, R, & Salah, R (2010). Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: a journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells. *Human reproduction update*, 16(5), 488-509. doi:10.1093/humupd/dmq002.

- Stocchi, V, Cucchiaroni, L, Magnani, M, Chiarantini, L, Palma, P, Crescentini, G (1985). Simultaneous extraction and reverse-phase highperformance liquid chromatographic determination of adenine and pyridine nucleotides in human red blood cells. *Anal Biochem*;146:118–24.
- Tarze A, Deniaud A, Le Bras M, Maillier E, Molle D, Larochette N et al. (2007) GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. *Oncogene* 26 (18):2606-2620.
- van den Berg DLC, Snoek T, Mullin NP, Yates A, Bezstarosti K (2010). An Oct4-centered protein interaction network in embryonic stem cells, *Cell Stem Cell*, 6(4):369-81
- Vander Heiden, MG, Chandel, NS, Schumacker, PT and Thompson, CB (1999). Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol. Cell* 3: 159–167.
- Varum, S., Rodrigues, A. S., Moura, M. B., Momcilovic, O., Easley, C. a, Ramalho-Santos, J., Van Houten, B., et al. (2011). Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts. *PloS one*, 6(6), e20914. doi:10.1371/journal.pone.0020914.
- Verfaillie, C (2009). Pluripotent stem cells. *Transfusion clinique et biologique : journal de la Société française de transfusion sanguine*, 16(2), 65-9. doi:10.1016/j.tracli.2009.04.006.
- Warburg, O (1956). On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124, 269-270.
- Weissman, IL, Anderson, DJ, Gage, F (2001). Stem and progenitor cells: Origins, Phenotypes, Lineage Commitments, and Transdifferentiations. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Vol. 17: 387-403
- Wobus, AM, & Boheler, KR (2005). Embryonic Stem Cells : Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy. *In vitro*, 635-678. doi:10.1152/physrev.00054.2003.
- Xu, R.-hua, Pelicano, H & Zhou, Y (2005). Inhibition of Glycolysis in Cancer Cells : A Novel Strategy to Overcome Drug Resistance Associated with Mitochondrial Respiratory Defect and Hypoxia Inhibition of Glycolysis in Cancer Cells : A Novel Strategy to Overcome Drug Resistance Associated with Mi. *Cancer Research*, 613-621.

Ying, QL, Nichols J, Chambers I, & Smith, A (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, 115(3), 281-92.

Yu, J, Thomson, JA (2008). Pluripotent stem cell lines. *Genes & Development* 22: 1987-1997.

Zaid, H, Abu-Hamad, S, Israelson, A, Nathan, I, & Shoshan-Barmatz, V (2005). The voltage-dependent anion channel-1 modulates apoptotic cell death. *Cell death and differentiation*, 12(7), 751-60. doi:10.1038/sj.cdd.4401599.